

Aus dem Institut für klinische Chemie am Klinikum  
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
Direktor: Frau Prof. Dr. U. Frick

und  
der BIOSERV AG Rostock

**Entwicklung einer Labormethode zum  
Nachweis der humanen pankreatischen  
Elastase in fäkalen Proben als Marker für die  
Diagnose einer exokrinen Pankreasinsuffizienz**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von  
Rainer Kleinert  
aus Greifswald

Greifswald 2001

## 1. Einleitung

Eine exokrine Pankreasinsuffizienz ist das gemeinsame Hauptsymptom zahlreicher, meist chronischer Pankreaserkrankungen. Die Hauptursachen sind jedoch die chronische Pankreatitis und das Pankreaskarzinom (Lankisch und Schmidt 1996). Zunehmender Alkoholkonsum (jeder Deutsche trinkt statistisch im Jahr 11,2 Liter reinen Alkohol) hat zur Folge, daß immer häufiger bei Patienten mit unklaren Oberbauchbeschwerden eine Pankreaserkrankung nachgewiesen oder ausgeschlossen werden muß. Ob eine Schädigung des Pankreas vorliegt, wird oft mit morphologischen Untersuchungsmethoden, wie Sonographie, Computertomographie, endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie abgeklärt. Neben den bildgebenden Verfahren stehen dem diagnostizierenden Arzt seit Jahren direkte Methoden (Sekretin-Pankreozy-min-Test, Lundh-Test), mit denen Parameter der Sekretion des Pankreas erfaßt werden, und indirekte Methoden (Pancreolauryl-Test, Chymotrypsin-Bestimmung), die durch das Erfassen einer Maldigestion Rückschlüsse auf eine gestörte Pankreassekretion ermöglichen, zur Verfügung. Besonders die indirekten Testmethoden sind gekennzeichnet durch eine relativ niedrige Spezifität und Sensitivität.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, eine indirekte Bestimmungsmethode für die Messung der humanen pankreatischen Elastase in fäkalen Proben zu entwickeln und an Patientenproben zu validieren. Die Methode zur Bestimmung der fäkalen Elastase soll, als Screening-Test eingesetzt, dem Arzt in der gastroenterologischen Praxis bei der Erstellung der sicheren Diagnose einer Pankreasinsuffizienz unterstützen und sich durch eine hohe Spezifität und Sensitivität bei der Erkennung bzw. dem Ausschluß einer Insuffizienz des exokrinen Pankreas auszeichnen.

Der Nachweis der humanen pankreatischen Elastase soll auf der Basis von polyklonalen Antikörpern erfolgen, die über eine hohe Spezifität zum Elastasemolekül verfügen. Für die Antikörperherstellung wurden Oligopeptide der humanen Pankreaselastase als Antigen eingesetzt.

Nach Abschluß der Entwicklungsarbeiten wird die Bestimmungsmethode in umfangreichen Untersuchungen an definierten Patientenproben validiert und auf ihre Eignung als Screening-Methode für die Diagnose von chronischen Erkrankungen des exokrinen Pankreas getestet.

### **1.1. Pankreaserkrankungen**

Das Pankreas ist eine etwa 4 cm dicke, 7 cm hohe, 11 cm lange und 60 – 100 g schwere Drüse. Es befindet sich quer im oberen Abdomen und liegt zwischen Ventriculus und Intestinum crassum an der hinteren Abdominalwand. Zusammen mit dem Gallengang mündet sein Ausführungsgang in das Duodenum. Das Pankreas hat sowohl eine endokrine als auch eine exokrine Funktion.

Der endokrine Teil, die Langerhans'schen-Inseln machen nur 1-2% des Pankreasgewebes aus. In den etwa 2 Millionen Inseln werden die beiden Schlüsselhormone des Kohlenhydratstoffwechsels Insulin und Glucagon gebildet und gespeichert. Die Sekretion dieser Hormone wird durch Somatostatin, dem dritten wichtigen Hormon, das in dem Inselapparat gebildet wird, den gastrointestinalen Hormonen und dem autonomen Nervensystem in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration des Blutes moduliert. Alle im endokrinen Teil des Pankreas synthetisierten Hormone sind Peptide. Das in den B-Zellen produzierte Insulin senkt drastisch die Glukosekonzentration im Blut durch mannigfaltige Wirkungen auf die Leber, Muskulatur und das Fettgewebe. In der Leber wird durch Insulin die Glukoseaufnahme und deren Einbau in die Speicherform Glykogen erhöht. Die Aufnahme von Glucose wird durch deren Phosphorylierung zu Glucose-6-Phosphat stimuliert. Gleichzeitig wird die Glykolyse (Metabolisierung von Glucose zu Pyruvat und Lactat) angeregt. Die Glykogenolyse wird gehemmt und die Glukoneogenese aus Aminosäuren blockiert. Insulin stimuliert in der Muskulatur durch ein spezifisches Carriersystem die Glucoseaufnahme. Der größte Teil der

aufgenommenen Glucose wird in Muskelglykogen umgewandelt und gespeichert. Nur ein geringer Teil der Glucose wird durch Glykolyse und Oxidation als Energieträger verwendet. Durch Insulin wird auch der Transport der Glucose in die Fettzellen stimuliert. Die Glucose wird in  $\alpha$ -Glycerophosphat umgewandelt, und damit wird die weitere Veresterung der Fettsäuren zu Triglyceriden verstärkt. Weiterhin ist Insulin ein anaboles Hormon, es wirkt antilipolytisch und hemmt die Proteolyse. Das in den A-Zellen der Langerhans'schen-Inseln synthetisierte Glucagon ist ein Antagonist des Insulins. Der wesentliche Effekt des Glucagons ist der Abbau von Glykogen zur Bereitstellung von Glucose. Durch Glucagon wird die Adenylatcyclase aktiviert. Zusammen mit dem cAMP als second Messenger werden die spezifischen Enzyme für den Glukose- und Fettmetabolismus stimuliert. Die Glykogenphosphorylase wird durch Phosphorylierung aktiviert, und damit wird der Abbau von Glykogen stimuliert. Die Glykogensynthetase wird gleichzeitig gehemmt. Das Insulin wirkt antagonistisch durch Aktivierung des G-Proteins, das die Adenylatcyclase inhibiert, auf diese Glucagoneffekte. Weiterhin stimuliert das Glucagon die  $\beta$ -Oxidation der freien Fettsäuren in der Leber, so daß die Bildung von Triglyceriden vermindert wird und dafür Ketokörper entstehen. Im Fettgewebe wirkt Glucagon lipolytisch. Freigesetzte Fettsäuren werden in der Leber durch Glucagon zu Ketoacetat umgebaut.

Das dritte wichtige Hormon, das Somatostatin, wird in den D-Zellen der Langerhans-Inseln gebildet. Dieses Hormon ist ein nahezu ubiquitäres regulatives Peptid. Im Inselapparat hemmt Somatostatin deutlich die Insulin- und Glucagonsekretion. Eine gestörte Biosynthese, eine verminderte Insulinsekretion oder eine verminderte Wirkung des Insulins an den Zielorganen führen zu einer pathologischen Erhöhung der Glucosekonzentration im Blut. Es kommt zu der am häufigsten auftretenden Kohlenhydratstoffwechselerkrankung, dem Diabetes mellitus, der außerdem bei Zerstörung der insulinbildenden Zellen auftritt.

Zum exokrinen Teil des Pankreas gehören die Azinuszellen und die Zellen des Ausführungsganges. 90% der in den Azinuszellen synthetisierten Proteine

sind Verdauungsenzyme, die in einem chloridreichen Saft mit neutralem pH-Wert gelöst sind. In der Mehrzahl handelt es sich um Hydrolasen, die verschiedene Substrate der Nahrung im Duodenum spalten (Tabelle 1).

Tabelle 1 Enzyme des Pankreassaftes (Schmidt und Thews 1990)

<u>Enzymwirkung</u>	<u>Hydrolytischer Angriffspunkt</u>
<b>Proteolytisch</b>	
Endopeptidasen	Innere Peptidbindung zwischen benachbarten Aminosäuren
Trypsin	Basischen Resten
Chymotrypsin	Aromatischen Resten
Elastase	Hydrophoben Resten im Elastin
Exopeptidasen	Terminale Peptidbindungen
Carboxypeptidasen	Carboxylgruppe
A und B	(A: nicht-basische, B: basische Reste)
Amino-peptidase	Aminorest
<b>Amylolytisch</b>	
$\alpha$ -Amylase	1,4- $\alpha$ -Glycosidbindungen in Glucosepolymeren
<b>Lipolytisch</b>	
Lipase	Esterbindungen
Phospholipase A	Triglyceriden in Position 1 und 3
Cholesterinasen	Phosphoglyceriden in Position 2
	Cholesterinestern
<b>Nucleolytisch</b>	
Ribonuclease	Phosphodiesterbindungen von Nucleotiden der Ribonucleinsäuren

Die proteolytischen Enzyme (Peptidasen) und die Phospholipase A werden als Vorstufen synthetisiert und müssen durch Enzyme der Duodenalschleimhaut (Enterokinasen) aktiviert werden. Das aus Trypsinogen aktivierte Trypsin setzt autokatalytisch die Aktivierung des Trypsinogens und die Aktivierung der

anderen Proteasen weiter fort. Lipase, Amylase und die Ribonucleasen werden bereits in aktiver Form sezerniert (Desai et al. 1992, Seno et al. 1995). Die Epithelzellen der Ausführungsgänge sezernieren eine alkalische Flüssigkeit mit hoher Bicarbonatkonzentration. In diesem isotonen Saft sind die Hauptanionen  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{Cl}^-$  sowie die Hauptkationen  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  enthalten. Die Kationenkonzentration bleibt bei der Stimulierung konstant, die Konzentrationen von  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{Cl}^-$  ändern sich spiegelbildlich zueinander. Die Bicarbonatkonzentrationen erreichen bei hoher Sekretion Werte von 130-140 mmol/l bei einem pH-Wert von 8,2. Das Bicarbonat des Sekrets wird zur Neutralisation der Salzsäure benötigt, die mit dem Chymus aus dem Magen in das Duodenum gelangt. Das Pankreassekret ist unabhängig vom Stimulationsgrad isotonisch zum Blutplasma.

Die Sekretion der Enzyme wird neural (Acetylcholin) und hormonal (Cholecystokinin) gesteuert. Durch die beiden Stoffe Acetylcholin und Cholecystokinin (CCK) wird im Inneren der Azinuszellen die Phosphatidylinositol-Signalkette aktiviert. Die Duktuszellen werden durch das Hormon Sekretin, das die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht, zur Sekretion der Bicarbonatflüssigkeit angeregt.

Bei der Stimulation des exokrinen Pankreas werden drei Phasen unterschieden. In der kephalen Phase regen sinnliche Wahrnehmungen (Aussehen, Geruch und Geschmack der Nahrung) die nervale Enzymsekretion an. Sie kann etwa 50% der Maximalrate betragen. Die Magendehnung über den vagovagalen Reflex und auch die durch Peptide und Aminosäuren ausgelöste antrale Gastrinausschüttung bewirken in der gastrischen Phase die azinäre Enzymsekretion. In der intestinalen Phase bewirken ein niedriger pH-Wert sowie die Anwesenheit freier Fettsäuren und Monoglyceride im Duodenallumen die Bicarbonatsekretion des Duktusepithels. Durch die beiden Fettbestandteile aber auch durch erhöhte Konzentrationen von Aminosäuren, Peptide,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen sowie allgemein osmotisch wirkende Teilchen im Duodenum wird durch das CCK eine vermehrte azinäre Enzymsekretion ausgelöst.

Werden die Pankreasenzyme nicht in ausreichender Menge produziert, so können die Nahrungsbestandteile nicht ausreichend enzymatisch gespalten werden, es kommt insbesondere zu Störungen bei der Fettverdauung. Ursachen für solche Störungen können Entzündungen der Bauchspeicheldrüse (Pankreatitis), Pankreaskopfkarzinome und die Mukoviszidose (Cystische Fibrose) sein. Ist das Pankreas nicht in der Lage, ausreichend Enzyme zu bilden, so spricht man von einer Pankreasinsuffizienz.

Zwischen den exokrinen und endokrinen Funktionsstörungen bestehen Wechselwirkungen. Löhr (1998) spricht von der Endo-Exo-Achse, d.h. liegt eine Störung der Inselzellenfunktion vor, wird also weniger Insulin gebildet, werden auch die exokrinen Zellen beeinflusst. Dies führt dazu, daß bei Diabetikern häufig eine sekretorische Pankreasinsuffizienz auftritt. Patienten mit einer chronischen Pankreatitis entwickeln im Laufe der Erkrankung einen Diabetes mellitus, da durch den Untergang des exokrinen Gewebes häufig auch das endokrine Gewebe in Mitleidenschaft gezogen wird.

#### **1.1.1. Akute Pankreatitis**

Unter einer akuten Pankreatitis versteht man die Entzündung des Pankreas. Die wichtigsten Mechanismen bei der akuten Pankreatitis sind die dystope Proteaseaktivierung in den Azinuszellen, die Blockade der luminalen Sekretion und die Bildung intrazellulärer Vakuolen (Schneider et al. 1999). Obwohl die Trypsinaktivierung die Aktivierung anderer Proteasen auslöst, führt nicht das Trypsin, sondern die nachfolgend aktivierten Enzyme (z.B. Chymotrypsin, Elastase und Phospholipase) zur Zell- und Gewebeschädigung (Hakansson et al. 1993, Niederau et al. 1997). Die Mechanismen der frühzeitigen Aktivierung der Pankreasenzyme mit einer nachfolgenden Selbstverdauung des Pankreas sind noch unklar (Mössner et al. 1993). Die Inzidenz der akuten Pankreatitis liegt bei 50-100 pro 100 000 Einwohner. Die Erkrankungsrate ist bei Frauen leicht höher als bei Männern. Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch ausgeprägte abdominale Schmerzen und

Allgemeinsymptome (Übelkeit, Erbrechen, Kreislaufschock) (Selberg et al. 1995). Die leichte Form, die ödematöse Pankreatitis (etwa 80%), ist durch einen unkomplizierten Verlauf und eine rasche (innerhalb von 72 h) Besserung unter adäquater Therapie gekennzeichnet. Die schwere Form, die hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis, wird durch Nekrosebildung und einen protrahierten Verlauf geprägt, wobei es häufig zu systemischen Komplikationen mit Versagen einzelner oder mehrerer Organsysteme kommt (Asanuma et al. 1999, Singer et al. 1988).

Morphologisch tritt eine Verdickung des exokrinen Pankreas, eine unregelmäßige Begrenzung der Drüse und Flüssigkeit im Pararenalraum auf. Hauptursache der akuten Pankreatitis ist wie bei der chronischen Form der erhöhte Alkoholkonsum (Bank et al. 1999, Lankisch und Büchler 2000).

Eingeklemmte Gallensteine, die möglicherweise über einen Reflux in den Pankreasgang gelangen, können zur akuten Pankreatitis führen (Niederau et al. 1997, Uhl et al. 1999, Sharma et al. 1999). Der Altersgipfel bei der Choledocholithiasis liegt zwischen 40-60 Jahren, beim Alkoholabusus zwischen 20-40 Jahren. Andere pathogenetische Faktoren sind seltener. Bei einem nicht unerheblichen Prozentsatz der Patienten mit akuter Pankreatitis wird kein Risikofaktor gefunden.

### **1.1.2. Chronische Pankreatitis**

Die chronische Pankreatitis ist eine schleichend progrediente Erkrankung, bei der das funktionstüchtige Pankreasgewebe im Rahmen eines sklerosierenden Prozesses allmählich degeneriert (Löser et al. 1996). Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei 2-10, die Prävalenz bei 20-70 pro 100 000 Einwohner. Epidemiologisch sind die Männer viermal häufiger von der chronischen Pankreatitis betroffen als Frauen. Die am meisten auftretenden klinischen Symptome sind rezidivierende Oberbauchschmerzen, Steatorrhoe und Gewichtsverlust, Diarrhoe sowie Übelkeit und Erbrechen. Die klinischen Zeichen einer exokrinen (Maldigestion, Steatorrhoe, Gewichtsverlust) und



zumeist auch einer endokrinen (Diabetes mellitus) Funktionseinschränkung entwickeln sich erst im Laufe vieler Monate und Jahre (Ammann 1991). Morphologisch ist die chronische Pankreatitis gekennzeichnet durch Verkalkungen, Pankreasgangsverbreiterungen und –stenosierungen, narbigen Organumbau, Fibrosen; später kommt es zur Organverkleinerung und zum Funktionsverlust des Pankreas. Die häufigste Ursache für die chronische Pankreatitis in den entwickelten Ländern ist der Alkoholmißbrauch. Man nimmt an, daß der Konsum von mehr als 80 g Alkohol pro Tag beim Mann und mehr als 40 g bei der Frau nach vier bis acht Jahren zu irreparablen Schäden führt. Die genauen Zusammenhänge sind noch nicht detailliert bekannt (Ammann 1991, Singh et al. 1990). Weitere Ursache ist die Choledocholithiasis, und in zunehmendem Maße wird diskutiert, daß der Diabetes mellitus eine viel größere Bedeutung als Ursache für die Pankreasinsuffizienz hat, als bisher angenommen (Hardt 1999). Darüber hinaus sind seltenere Ursachen wie Hyperparathyreoidismus oder eine tropische Form bekannt. Bei 15% der Patienten tritt eine idiopathische juvenile bzw. senile Form auf. Die chronische Pankreatitis ist in der Regel eine lebenslange persistierende Krankheit, die durch rezidivierende Schübe gekennzeichnet ist.

### **1.1.3. Pankreaskarzinom**

Das Pankreaskarzinom ist ein schnell wachsender Tumor mit hoher Letalität. Etwa 90% aller Pankreasneoplasien sind duktale Adenokarzinome (Howard et al. 1997, Hidalgo et al. 1999). Die Inzidenz beträgt 2-10 pro 100 000 Einwohner. Die Häufigkeit hat sich in den letzten 50 Jahren verfünffacht. Die Erkrankung steht bereits an vierter Stelle der durch Malignome bedingten Todesursachen in Europa und Nordamerika (Roder 1997). Jährlich sterben in Deutschland etwa 10 000 Menschen an einem Pankreaskarzinom (Bonnar 1997). 70% der Pankreaskarzinome finden sich im Pankreaskopf, 20% im Corpus und 10% im Pankreasschwanz.

Im Frühstadium ist der Tumor asymptomatisch. Die ersten Beschwerden sind meist uncharakteristisch und verlaufen schleichend, sehr häufig kommt es zu Gewichtsverlust und progredienten Schmerzen. Bei 80% der Patienten mit einem Pankreaskopfkarzinom entsteht durch Infiltration der Gallenwege ein Ikterus. Die Diagnose ist besonders schwierig bei kleinen Karzinomen (Furukawa et al. 1996).

Die Erkrankungsursachen sind unklar. Begünstigend für die Ausbildung eines Pankreaskarzinoms wirken die chronische Pankreatitis, Alkohol, Nikotin und karzinogene Nahrungsbestandteile (Lowenfels et al. 1993). Die Inzidenz bei Rauchern ist dreimal höher als bei Nichtrauchern.

Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt unter sechs Monate, die Fünf-Jahres-Heilung liegt unter 1%.

#### **1.1.4. Mukoviszidose (zystische Fibrose)**

Die Mukoviszidose ist durch eine Dysfunktion der exokrinen Drüsen (Bronchus-, Pankreas-, Schweiß-, Speichel-, Ductus deferens-Drüsen) gekennzeichnet. Sie ist die häufigste monogenetische Erkrankung der weißen Bevölkerung. Der Erbgang ist autosomal-rezessiv. In Mitteleuropa tritt statistisch bei jeder 2500. Geburt die zystische Fibrose auf (Slesinski et al. 1994). Bei schwarzen Amerikanern kommt eine Erkrankung auf 17 000 Geburten (Kulczycki et al. 1974) und bei der asiatischen Bevölkerung Hawaiis auf 90 000 Geburten (Wright und Morton 1968). In Deutschland leiden etwa 8 000 Kinder und junge Erwachsene an der Mukoviszidose. Jedes Jahr werden etwa 400 Kinder mit dieser Erbkrankheit geboren. Statistisch gesehen, trägt etwa jeder 25. Bundesbürger (rund 4 Mill.) das defekte Gen in sich. Das pathologische Gen und sein Produkt (CF-Transmembran-Regulator) sind seit 1989 bekannt. Lokalisiert ist es auf dem langen Arm des Chromosomen 7 (Rommens et al. 1989, Dörk et al. 1994). Durch diesen genetischen Defekt ist die Regulation des zellulären Chloridtransports gestört (Slesinski et al. 1994, Choudari et al. 1999). Es kommt zu Sekretionsveränderungen der Bronchien,

des Pankreas, der Schweißdrüsen, der Galle, der Darmschleimhaut und anderer exokriner Drüsen. Die Sekrete werden dehydratisiert und eingedickt, es kommt zu einer Viskositätssteigerung. Der gestörte transepitheliale Transport von Natrium- und Chloridionen führt in der Lunge zur Verlegung der Atemwege mit zähem Schleim und konsekutiver Infektion (Staphylokokken, Pseudomonas). Als Folge treten Bronchitis, Bronchopneumonie, Bronchiektasen und zunehmende respiratorische Insuffizienz auf. Durch Verlegung der Pankreasausführungsgänge kommt es zur Pankreasinsuffizienz. Als Symptome treten im Säuglingsalter Gedeihstörungen, Durchfälle und chronischer Husten auf. Später kommt es zusätzlich zu purulentem Auswurf, Dyspnoe und pulmonaler Kachexie. Häufig treten Rhinorrhoe und Sinusitis auf.

In den 80er Jahren lag das Durchschnittsalter der Mukoviszidose-Patienten bei acht Jahren. Dank der fortgeschrittenen Therapie und der verbesserten Diagnostik liegt die Lebenserwartung heute im Schnitt bei 15 Jahren. Nur jeder dritte Erkrankte ist 18 Jahre und älter. Bei jetzt geborenen Kindern mit einer zystischen Fibrose wird mit einer Lebenserwartung von mehr als 40 Jahren gerechnet. Nach einer bilateralen Lungentransplantation beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 60%.

## **1.2. Verfahren für die Diagnose einer Pankreasinsuffizienz**

Die Diagnose einer Pankreasinsuffizienz erfordert neben der typischen Anamnese und Klinik den Nachweis charakteristischer morphologischer und/oder funktioneller Veränderungen. Für die Erfassung der morphologischen Parameter werden bildgebende Verfahren eingesetzt. Die funktionellen Kriterien können mit direkten und indirekten Pankreasfunktionstests erfaßt werden. Wegen der schlechten Korrelation zwischen den morphologischen und funktionellen Parametern in der Frühphase der Erkrankung sind beide diagnostische Methoden komplementär einzusetzen (Löser et al. 1996).

### 1.2.1. Morphologische Untersuchungsmethoden (Bildgebende Verfahren)

Die wichtigsten in der Klinik eingesetzten bildgebenden Verfahren sind die Sonographie, die Computertomographie und die endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP). Die Endosonographie und die Röntgen-Zielaufnahme des Pankreas sind weitere bildgebende Verfahren, die dem Gastroenterologen für die Diagnostik einer Pankreasinsuffizienz zur Verfügung stehen. Zwei sehr moderne Verfahren zur Diagnostik von Pankreaserkrankungen, die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Magnetresonanz Cholangio-Pankreatographie (MRCP) sind eine interessante Erweiterung des diagnostischen Spektrums. Diese Verfahren sind in der Klinik noch nicht ausreichend validiert, so daß über ihre Sensitivität und Spezifität keine abschließende Bewertung vorgenommen werden kann.

Die **Sonographie** ist das bildgebende Verfahren der ersten Wahl. Sie ist ohne Belastung und Nebenwirkungen für den Patienten überall einsetzbar. Mit dieser Methode können Pankreasverkalkungen aufgezeigt werden. Eine Beurteilung von Pankreaspseudozysten, Abszessen und Tumoren ist möglich. Die Sensitivität der Methode bei einer chronischen Pankreatitis liegt bei 70-80% bei einer Spezifität von 80-90% (Löser et al. 1996, Bosseckert 1990, Lankisch et al. 1990, Steer et al. 1995). In der Frühphase der chronischen Pankreatitis sowie bei vorhandenem Meteorismus ist eine sonographische Beurteilung schwierig und stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig. Neben der Sonographie sollte zum Nachweis von multiplen Pankreasverkalkungen immer eine **röntgenologische Pankreaszielaufnahme** angefertigt werden, um damit die Verdachtsdiagnose einer Pankreasinsuffizienz zu sichern (Löser et al. 1996).

Wenn eine Ultraschalluntersuchung unklare Befunde zeigt, dann sollte eine **Computertomographie** durchgeführt werden. Darüber hinaus dient die Computertomographie der Verifizierung lokoregionaler Komplikationen

(Pseudozystenbildung, Milzvenenthrombose, Affektion benachbarter Organe). Die Sensitivität und Spezifität dieser Verfahren liegt beim Nachweis bzw. Ausschluß einer chronischen Pankreatitis bei 80-90% (Bosseckert 1990, Lankisch et al. 1990, Steer et al. 1995, Löser et al. 1996, Krestin 1996, Kenneth et al. 1999). Die **endoskopisch retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP)** ist mit einer Sensitivität und Spezifität von 90-95% für die Diagnose der chronischen Pankreatitis das beste bildgebende Verfahren (Lankisch 1990, Pencev et al. 1994, Steer et al. 1995, Löser et al. 1996, Arvanitidis et al. 1998). Mit diesem Verfahren können vor allen Dingen in der Frühphase der Erkrankung Veränderungen im Gangsystem der Bauchspeicheldrüse erfaßt und ein Pankreaskarzinom differentialdiagnostisch von der chronischen Pankreatitis abgegrenzt werden. Durch die in diesem Untersuchungsverfahren notwendigen Kontrastmittel besteht das Risiko, beim Patienten eine Post-ERCP-Pankreatitis hervorzurufen (Dominguez-Munoz et al. 1995, Peters et al. 1999). Die **Endosonographie** ist ebenfalls ein sehr empfindliches Verfahren zur Diagnose einer chronischen Pankreatitis, die besondere Bedeutung bei der Abgrenzung fokaler und regional begrenzter Formen der chronischen Pankreatitis besitzt (Löser et al. 1996).

#### **1.2.2. Funktionelle Untersuchungsmethoden (direkte und indirekte Pankreasfunktionsteste)**

Das Pankreas verfügt über eine große funktionelle Reservekapazität. Exokrine Pankreasinsuffizienz mit den klinischen Zeichen von Steatorrhoe und Gewichtsverlust tritt im Verlauf einer chronischen Pankreatitis erst nach einem Ausfall der Drüse von mehr als 90% auf. Aus diesem Grund ist es wichtig, daß die Pankreasfunktionsteste eine Pankreasfunktionseinschränkung sehr früh anzeigen.

## **Direkte Pankreasfunktionsteste**

Der **Sekretin-Caerulein** bzw. **Sekretin-Cholecystokinin-Test** ist der sensitivste Test zur Erfassung einer zunehmenden exokrinen Pankreasfunktionseinschränkung. Er ist damit der beste aller Pankreasfunktionsteste (Skala et al. 1985, Niederau et al. 1985, Lankisch 1993). Der Patient wird mit einer doppelumigen, bis ans Treitz'sche Band vorgeschobenen, duodenalen Sonde versorgt, über die dann das nach intravenöser Sekretin- bzw. Sekretin- und Caeruleingabe stimulierte Pankreassekret abgesaugt wird. In dem gewonnenen Sekret werden die Pankreasenzyme Amylase, Lipase und Trypsin als Parameter für die enzymsekretorische Pankreasfunktion und das Volumen und der Bicarbonatgehalt für die hydrokinetische Funktion bestimmt. Dieses Testverfahren ist international leider nicht standardisiert, sehr zeit- und kostenaufwendig. Aus diesen Gründen ist dieser Test für die Routinediagnostik schlecht geeignet und bleibt in der Regel pankreatologisch orientierten Zentren vorbehalten.

## **Indirekte Pankreasfunktionsteste**

Die Qualität der indirekten Testsysteme hängt insbesondere von der sensitiven Erfassung der für die differentialdiagnostisch wichtigen frühen Phase der chronischen Pankreatitis ab. Alle Versuche, indirekte, sondenlose Pankreasfunktionsteste als Ersatz für den direkten Sekretin-Caerulein-Test zu entwickeln, haben bisher noch keinen überzeugenden Fortschritt gebracht.

## **Orale Belastungsteste zur Erfassung der exokrinen Pankreasfunktion**

In dem 1962 entwickelten **Lundh-Test** wird zur Stimulation der Pankreassekretion ein Testmahl verwendet, und nachfolgend wird die Konzentration der Pankreasenzyme (Trypsin, Lipase) im Duodenalsekret

gemessen. Die Aussage des Lundh-Testes über eine exokrine Pankreasfunktionseinschränkung ist durch die Abhängigkeit von der Intaktheit der Magen-Darm-Passage, der endogenen Hormonfreisetzung und der Innervation des Pankreas limitiert. Die Sensitivität des Testes liegt bei 66-94% (Bank et al. 1994).

Der **NBT-PABA-Test (N-Benzoyl-L-Tyrosyl-P-Aminobenzoessäure)** wurde ursprünglich zum Nachweis der exokrinen Pankreasinsuffizienz bei Tieren entwickelt (Gyr et al. 1976). Das Prinzip des Testes beruht auf der Spaltung des synthetischen Tripeptids N-Benzoyl-L-Tyrosyl-P-Aminobenzoessäure durch Chymotrypsin mit anschließender Freisetzung von Paraaminobenzoessäure (PABA). Die freigesetzte PABA wird im Darm resorbiert, zum Teil in der Leber konjugiert und im Harn ausgeschieden. Die im Urin gemessene PABA spiegelt indirekt die Konzentration des sezernierten Chymotrypsins wider. Die Angaben zur Sensitivität des Testes im Nachweis der chronischen Pankreatitis werden mit 34 bis 85% und die der Spezifität mit 39 bis 87% angegeben (Niederau et al. 1985, Lang et al. 1984).

Der **Pancreolauryl-Test (Fluoreszeindilaurat-Test)** galt bisher als bester indirekter Test für die Diagnose einer Pankreasinsuffizienz. Der Test beruht auf der Messung von freiem Fluorescein, das nach Einwirkung der pankreatischen Cholesterolesterase auf das Fluorescein-Dilaurat freigesetzt wird. Das Fluorescein-Dilaurat wird oral mit einem standardisierten Frühstück eingenommen. Das nicht abgespaltene und weiter metabolisierbare Fluorescein wird im Urin gemessen. Die Angaben über die Sensitivität und Spezifität des Testes in der Literatur schwanken von 55-100% bzw. 39-100% (Kaffarnik et al. 1969, Ventrucchi et al. 1983).

Im **Atemtestverfahren** wird zusammen mit einem Frühstück Cholesteryl-<sup>14</sup>C-Octanoat gegeben. Das Substrat wird durch pankreasspezifische Cholesterolesterase hydrolysiert. Die aus der Esterbindung abgespaltene mittelkettige Fettsäure <sup>14</sup>C-Octanoat wird über die Duodenalmukosa absorbiert und zu <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> metabolisiert, das in der Atemluft gemessen wird. In einem anderen Verfahren wird 1,3 Distearyl, 2(Carboxyl-<sup>13</sup>C) Octanoylglycerol in einem

Testmahl dem Patienten verabreicht. Analysiert wird das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis in der Atemluft (Murphy et al. 1990, Löser et al. 1997). Die Sensitivität der Teste ist für die Erfassung von leichten und mittleren Formen der exokrinen Pankreasinsuffizienz zu gering. Daher sind diese Methoden ungeeignet. .

### **Serumenzymdiagnostik**

Die **Amylase-, Lipase- und Trypsinogenbestimmung** im Serum haben für die Diagnose einer Pankreasinsuffizienz keine Bedeutung. Erst im Spätstadium der chronischen Pankreatitis treten infolge der progressiven Destruktion des exokrinen Pankreas hohe Serumwerte der Pankreasenzyme auf. Einige Autoren sehen in der Bestimmung der pankreatischen Enzyme für die Beurteilung der exokrinen Pankreasfunktion von Mukoviszidose-Patienten eine gewisse Bedeutung (Abrams et al. 1984, Goldberg 1984, Cleghorn et al. 1986). Für die Diagnose der akuten Pankreatitis sind sowohl die Lipase, Amylase als auch das Trysinogen wichtige Marker (Moller-Petersen et al. 1986, Ventrucchi et al. 1992, Keim et al. 1998, Lankisch et al. 1998).

### **Stuhldiagnostik**

Methoden der Stuhldiagnostik zur Erkennung von Pankreaserkrankungen wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben. Die im exokrinen Pankreas synthetisierten Enzyme werden während der Darmpassage nur teilweise bzw. gar nicht zerstört, so daß sie im Stuhl als meßbare Konzentrationen bestimmt werden können (Goldberg et al. 1993).

Die **Fettbestimmung im Stuhl** ist eine der ältesten Methoden für die Beurteilung der sekretorischen Leistung des exokrinen Pankreas. Das Verfahren wurde von van de Kramer 1949 standardisiert und ist auch heute noch eine oft eingesetzte Methode. Dem Patienten werden Testmahlzeiten mit definiertem Fettgehalt verabreicht. Die Stühle werden über drei Tage



gesammelt, homogenisiert und dann entweder der Gesamtfettgehalt oder die freien Fettsäuren analytisch bestimmt (Bank et al. 1994, Lankisch 1993, Volkmann et al. 1998). Das Testverfahren weist eine schlechte Praktikabilität auf, weil es eine sehr hohe Disziplin der Patienten bei der Nahrungsaufnahme voraussetzt. Störend auf das Testergebnis können sich der bakterielle Fettabbau im Kolon und im Stuhl vorhandene Lipide aus abgeschilferten Epithelzellen oder bakteriellen Ursprungs auswirken.

Die **Chymotrypsinbestimmung** im Stuhl ist auf Grund der großen Stabilität des Enzyms ein Meßverfahren, das für die Diagnose einer Pankreasinsuffizienz sehr vorteilhaft ist (Haverback et al. 1963, Ammann et al. 1968, Lawson et al. 1994). Die Chymotrypsinwerte im Stuhl bleiben über mehrere Tage konstant, so daß ein Postversand der Proben durchgeführt werden kann. Die Chymotrypsinbestimmung wird photometrisch mit kommerziell erhältlichen Testen in spezialisierten Laboren durchgeführt. Ein großer Nachteil dieses Testsystems besteht in der nicht vorhandenen Humanspezifität. Pankreasenzympräparate müssen mindestens drei Tage vor der Stuhlentnahme abgesetzt werden. Falsch pathologische Ergebnisse können durch Durchfallerkrankungen, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Sprue und Eiweißmangel im Rahmen von konsumierenden Erkrankungen auftreten. In Auswertung mehrerer Studien wurde für die Chymotrypsinbestimmung eine Sensitivität von 78% und eine Spezifität von 84% ermittelt (Niederau et al. 1985, Lankisch et al. 1989, Lankisch et al. 1993). Bei geringer exokriner Pankreasinsuffizienz zeigt sich in fast allen Studien eine niedrige Sensitivität.

Die Bestimmung der **pankreatischen Amylase** im Stuhl hat gegenüber der Chymotrypsinbestimmung in der Sensitivität und der Spezifität keine signifikanten Unterschiede, so daß sich dieses Testverfahren nicht als diagnostische Methode für die Diagnose einer Pankreasinsuffizienz durchsetzen konnte. Das Pankreasenzym kann mittels Amylase-spezifischer Antikörper in einem Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) nachgewiesen werden.

Eine Alternative zur Chymotrypsinmessung ist die Bestimmung der **pankreatischen Elastase**. B  hler und Mitarbeiter verwendeten bereits 1986 einen Radioimmuno-Test für die Bestimmung der pankreatischen Elastase im Serum, um die akute Pankreatitis zu diagnostizieren. Die Sensitivität und die Spezifität des Testes waren höher als bei parallel eingesetzten Methoden zur Bestimmung der Lipase,  $\alpha$ -Amylase und des Trypsins. 1992 wurden zwei ELISA's auf der Basis von jeweils zwei monoklonalen Elastase E1-spezifischen Antikörpern von der Firma ScheBo Tech GmbH Wettenberg vorgestellt (Scheefers-Borchel et al. 1992). Der für die Bestimmung der Elastase E1 im Serum entwickelte ELISA erlaubt die Erfassung des Enzyms, das während einer akuten Entzündungsphase retrograd in das Serum abgegeben wird. Damit ist eine Diagnose bzw. der Ausschluß einer akuten Pankreatitis möglich (Ventrucci et al. 1992, Hakansson et al. 1993, Tietz 1997, Millson et al. 1998).

Der ELISA zur Bestimmung der Elastase E1 im Stuhl nutzt die außergewöhnliche Stabilität des Markers bei der Darmpassage. Die Elastase unterscheidet sich wesentlich in der Darmstabilit  t von Chymotrypsin und Lipase. Das Enzym wird in etwa fünffach höherer Konzentration, gemessen an der Pankreassaftkonzentration, im Stuhl ausgeschieden. Von der Chymotrypsinkonzentration des Pankreassekrets können etwa nur 0,5% der Aktivität im Stuhl nachgewiesen werden (Krause 1989, Stein et al. 1996).

Langzeituntersuchungen mit täglicher fäkaler Elastase-Bestimmung ergaben, daß die individuelle Tagesvariation der fäkalen Elastaseausscheidung außerordentlich gering ist, so daß schon eine einmalige Stuhlanalyse weitgehend als repräsentativ angesehen werden kann (Löser 1995).

Ein weiterer Vorteil der Elastasebestimmung liegt in der hohen Spezifität der eingesetzten Antikörper. Kreuzreaktivitäten mit allen inneren humanen Organen und mit Extrakten aus dem Pankreas anderer Species treten nicht auf (Scheefers-Borchel et al. 1992). Damit ist der Test unabhängig von Substitu- tionsmitteltherapien durchführbar (Stein 1997).

Studien von Stein (1997) und Löser (1998) zeigen zwar, daß der Sekretin-Cerulein-Test weiterhin das beste Nachweissystem der Pankreasfunktionsdiagnostik bleibt, daß der Elastase-Test mit 63% bei einer leichten und 100% Sensitivität bei einer mittleren bzw. schweren chronischen Pankreatitis bei 93% Spezifität sehr gut mit dem Sekretin- Cerulein-Test korreliert.

In drei repräsentativen Studien (Löser et al. 1996, Stein et al. 1996, Gullo et al. 1999) konnte die Überlegenheit der Elastasebestimmung gegenüber der Chymotrypsinmessung deutlich nachgewiesen werden. Andere Studien hingegen zeigten keine signifikanten Vorteile des Elastase-Testes (Dominguez-Munoz et al. 1995, Ammann et al. 1996, Glasbrenner et al. 1996, Volkmann et al. 1998). Daher empfehlen diese Autoren, beide Testsysteme parallel als Screening-Teste in der Stuhldiagnostik der chronischen Pankreatitis einzusetzen.

Auch bei anderen Erkrankungen des exokrinen Pankreas, die mit einer sekretorischen Pankreasinsuffizienz einhergehen, wird der Elastase-Test eingesetzt. Bei Patienten mit einer Mukoviszidose (zystische Fibrose) zeigte der Test bei 186 Stuhlproben von 71 Kindern eine Sensitivität von 94% und eine Spezifität von 98%. Damit lagen diese Werte höher als bei Erwachsenen mit chronischer Pankreatitis (Stein 1997). Auch andere Autoren kommen in Studien zu ähnlichen Ergebnissen und empfehlen den Elastasetest für die Diagnose einer Pankreasinsuffizienz bei der zystischen Fibrose (Terbrack et al. 1996, Phillips et al. 1999, Wallis et al. 1997, Leus et al. 2000).

Bei Patienten mit chronischer Pankreatitis besteht ein signifikant erhöhtes Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Lowenfels et al. 1993). Mit der Elastasebestimmung ist es, ähnlich wie mit den anderen direkten und indirekten Pankreasfunktionstests, nicht möglich, zwischen einer chronischen Pankreatitis und einem Pankreaskarzinom zu differenzieren. Für die Tumordiagnose sind die bildgebenden Verfahren besser geeignet (Löser 1998). Schlußfolgernd empfehlen Löser et al. (1998) für die klinische Routine

bei Verdacht einer chronischen Pankreatitis die Sonographie, die ERP/ERCP sowie die Elastasebestimmung im Stuhl.

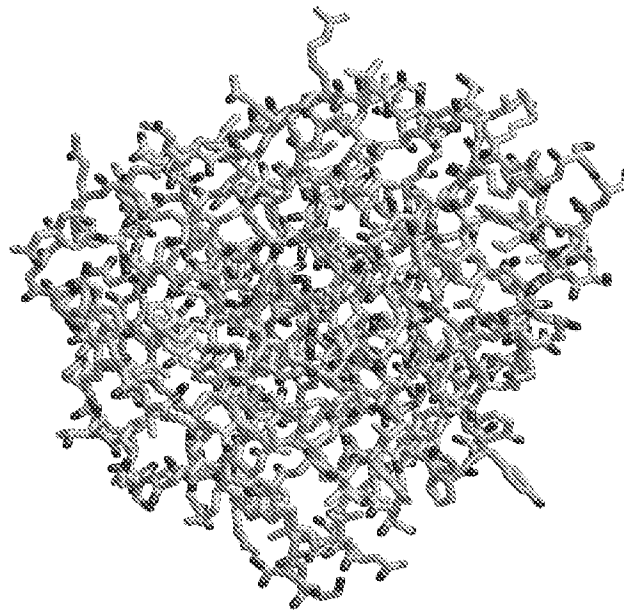
### **1.3. Chemie und Biochemie der pankreatischen Elastase**

Die pankreatische Elastase (Pancreatopeptidase E, EC 3.4.21.36) ist ein säureempfindliches Verdauungsenzym, das im Pankreas gebildet und als Zymogen (Proelastase) gespeichert wird (ein Modell des Elastasemoleküls ist in der Abb. 1 dargestellt). Die Konzentration der Elastase im Pankreassaft liegt zwischen 0,17 und 0,36 mg/ml, das entspricht 3 bis 6% des Proteingehalts. Pro Tag werden 0,5 bis 1g Elastase vom exokrinen Pankreas produziert (Ohlsson et al. 1976). Mallory und Travis charakterisierten dieses Enzym 1975 erstmals unter der Bezeichnung Protease E. Ein Jahr später wurden von Largmann und Mitarbeitern (1976) zwei verschiedene Elastin spaltende Enzyme isoliert. Die Daten des Enzyms Elastase 1 entsprachen weitgehend denen der Protease E. Die humane pankreatische Elastase ist ein Glykoprotein mit Blutgruppenantigenität (Wendorf et al. 1991). Das Enzym besitzt eine außergewöhnliche Stabilität und übersteht die Darmpassage fast unbeschadet. In einem 50 mM Tris/ 100 mM NaCl-Puffergemisch (pH 7,4) ist die Elastase 1 bei 4°C über Monate stabil. Bei 22°C beträgt der Aktivitätsverlust des Enzyms pro Woche 8%. Bei 56°C ist die Elastase 1 innerhalb von 5 min inaktiviert.

Die Elastase gehört zu den Serin-Proteinasen. Nach der proteolytischen Aktivierung durch Trypsin im Duodenum spaltet das Enzym hydrolytisch die Peptid-Ketten des Hämoglobins, Albumins, Caseins u.a. Proteine und insbesondere des Fibrins, das den anderen Endopeptidasen nicht zugänglich ist. Auf Grund der Tertiärstruktur spaltet die Elastase nur Peptidbindungen, deren Aminosäuren keine aromatischen oder raumerfüllenden Seitenketten besitzen. Die Angriffspunkte des Enzyms sind die Aminosäuren Alanin, Valin und Leucin (Doppl et al. 1994). In den Blutkreislauf gelangte pankreatische

Elastase wird an die Inhibitoren  $\alpha_1$ -Antitrypsin und  $\alpha_2$ -Makroglobulin gebunden, um die Zerstörung körpereigenen Bindegewebes zu verhindern. Sziegoleit und Lindner (1991) beschrieben neben der proteolytischen Aktivität die Fähigkeit der pankreatischen Elastase, sich mit Gallensalzen und Neutralsteroiden zu verbinden. Dadurch wird während der Darmpassage die Rolle eines Transportproteins für Cholesterin und seine bakteriellen Abbauprodukte Koprostanol und Koprostanon übernommen. Im Enddarm kommen auf ein Elastase-Molekül durchschnittlich 75 Moleküle der Neutralsteroiden (Sziegoleit et al. 1991). Diese Sonderfunktion der Elastase ist nur durch die Stabilität des Enzyms während der Darmpassage möglich. Auf Grund der außergewöhnlichen Stabilität sehen Sziegoleit und Lindner (1991) in der pankreatischen Elastase einen geeigneten Parameter für die Diagnose der chronischen Pankreatitis.

Abb. 1 Modell des Elastasemoleküls



Die Pankreaselastase 1 hat ein Molekulargewicht von ca. 28 KDa bei einem Molekularradius von 2,3 nm. Der Isoelektrische Punkt liegt bei pH 4,9 (Sziegoleit et al. 1991). Der Sedimentationskoeffizient ( $S_{20W}$ ) beträgt 2,8 S.

Außer den oben bereits erwähnten Isoformen der pankreatischen Elastase wurden von Kawashima et al. (1987) für die Elastase II zwei sich im Signalpeptid unterscheidende Formen gefunden. Die Elastase IIA ist im 16 Aminosäuren umfassenden Rest homolog zu der Elastase II. Die Elastase IIB weist eine Homologie von 50% auf. Die beiden Isoformen sind über die gesamte Aminosäuresequenz zu 90% homolog.

Tani et al. (1988) beschrieben zwei weitere Isoformen der Elastase. Die in ihrer Arbeit beschriebenen Isoformen Elastase IIIA und IIIB unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz von den Isoformen I, IIA und IIB.

## **2. Material und Methoden der Entwicklung einer Methode zum Nachweis der pankreatischen Elastase in fäkalen Proben**

Die zu entwickelnde Nachweismethode sollte den Erfordernissen eines modernen diagnostischen Testsystems gerecht werden. Wir entschlossen uns für den Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Dieses moderne Testprinzip ist weltweit verbreitet. Die technischen Erfordernisse in den medizinischen Laboren sind gering. Zu den üblichen Arbeitsmitteln Pipetten, Glas- und Plastikmaterialien usw. ist nur ein ELISA-Plattenlesegerät (ELISA-Reader) erforderlich, so daß ein ELISA in jedem Labor durchgeführt werden kann.

### **2.1. Auswahl der Peptide zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern**

Peptide werden vorrangig als Antigen für die Antikörperherstellung verwendet, wenn das Antigen eine hohe Homogenität in der Aminosäuresequenz mit anderen Tierarten aufweist, aber eine hohe Spezifität der Antikörper für eine Species gefordert ist. Soweit bekannt ist, wird die Elastase als Bestandteil des Verdauungs-Enzymmusters von allen Mammalia im Pankreas gebildet. Die

humanen Elastasen besitzen eine hohe Homogenität in der Aminosäuresequenz mit der pankreatischen Elastase anderer Säugetiere. Da in der Humanmedizin bei der Therapie einer Pankreasinsuffizienz Pankreaspräparate des Schweines zur Substitution eingesetzt werden, war es besonders wichtig, daß wir Aminosäuresequenzen auswählten, die nicht Bestandteil des porcinen Elastasemoleküls sind, damit die von uns hergestellten Antikörper keine Kreuzreaktivität mit den Substitutionsmitteln aufweisen. Ein weiteres Kriterium für die Auswahl der Oligopeptide bildete die räumliche Anordnung der Aminosäuresequenz in der Elastase. Die Peptidsequenzen mußten äußerer Bestandteil der Proteinstruktur sein, damit diese stark immunogen sind, d. h. sie müssen eine Antikörperbildung im Versuchstier auslösen. Als dritte Voraussetzung mußte die Rechtsmittelfreiheit gegeben sein, das bedeutete, daß die von uns ausgewählten Sequenzen nicht identisch sein durften mit bereits patentrechtlich geschützten Aminosäureabschnitten des Elastasemoleküls (z.B. Europäisches Patent: EP-B-0547059).

Die von Ito et al. (1986) und Yoshiharu et al. (1987) beschriebenen Aminosäuresequenzen der porcinen pankreatischen Elastase wurden als Grundlage für den Ausschluß der Homologie zwischen der humanen und der porcinen Elastase verwendet.

Für die Auswahl der immunreaktiven Oligopeptide der pankreatischen Elastase benutzten wir das Computerprogramm Swiss-Prot. Wie der Tabelle 2 zu entnehmen ist, wählten wir für die vier Isoformen der Elastase 11 geeignete Aminosäuresequenzen aus. Die Sequenzen der Isoformen IA und IB wurden mit denen von Largman et al. (1976) und Ohlsson et al. (1976) beschriebenen Elastasestrukturen verglichen und auf Richtigkeit überprüft. Für die Überprüfung der ausgewählten Oligopeptide der Isoform II wurden die Veröffentlichung von Kawashima et al. (1987) und für die Isoform III die Ergebnisse von Tani et al. (1988) herangezogen. Die ausgewählten und an Hand der Literatur überprüften Sequenzen wurden von Mitarbeitern der

BIOSYNTAN Gesellschaft für bioorganische Synthese mbH Berlin synthetisiert.

Peptide werden auf Grund ihrer Größe vom Immunsystem der Versuchstiere als Antigen nur erkannt, wenn sie als Hapten injiziert werden, d.h. wir mußten unsere Peptide an Carrierproteine koppeln. Als Trägerprotein verwendeten wir Hemocyanin vom Keyhole Limpets. Die Kopplung erfolgte mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid nach der Methode von Hermanson (1996).

Tab. 2      Aufstellung der Oligopeptide, die für die Immunisierung zur Herstellung von Anti-Elastase-Antikörpern eingesetzt wurden

Peptid Nr.	Sequenz	Masse [Dalton]	Reinheit [%]
10	AVKEGPEQVIPIN	1393,6	89
11	YTNGPLPDKLQQAR	1600,8	95
12	RSGCNGDSGGPLN	1232,3	90
13	GPLNCPTEDGGWQ	1372,5	90
758	GTEAGRNSWPSQI	1402,5	92
759	HNLSQNDGTEQYV	1504,5	89
760	WGKTKTNGQLA	1203,4	94
761	VSSRGCNVS RKPT	1389,6	90
762	GGEEARPNSWPWQ	1513,6	90
763	KDWNSNQISKGND	1505,6	92
764	GALPDDLKQGRL	1282,5	90

## 2.2. Herstellung der polyklonalen Antikörper

Als Versuchstiere für die Gewinnung der polyklonalen Antikörper setzten wir Kaninchen ein. Für die Immunisierungsversuche wurden nur Tiere



herangezogen, denen nach einer vierwöchigen Quarantäne vom verantwortlichen Veteri-

närmediziner ein guter physischer Zustand bestätigt wurde. Die Versuchstiere wurden unter artgerechten Bedingungen gehalten und standen unter regelmäßiger tierärztlicher Betreuung.

Die für die Immunisierung vorgesehenen Peptid-KLH-Konjugate wurden in steriler, phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung auf 200 µg/ml bzw. 100 µg/ml Peptidantigen verdünnt. Diese Antigenlösung wurde mit einem von der Firma Biogenes GmbH Berlin speziell für Immunisierungen entwickeltes Adjuvants im Verhältnis von 1:2 gemischt.

Pro Peptid wurden zwei Kaninchen immunisiert. Den Versuchstieren wurde vor der Immunisierung Blut (Primärblut) entnommen, um ausschließen zu können, daß die Tiere in ihrem vorhandenen Antikörperstatus Immunglobuline haben, die mit unseren Peptidsequenzen ungewollte Kreuzreaktionen eingehen. Ein nicht immunisiertes Tier diente während der Versuchsdauer als Kontrolltier.

Die erste und die nach 14 Tagen vorgenommene zweite Immunisierung wurden mit einer Antigenkonzentration von 200 µg/ml pro Impfdosis durchgeführt.

Für die drei weiteren Immunisierungen wurden 100 µg/ml Antigen eingesetzt. Das Volumen der jeweils verabreichten Dosis betrug 1ml. Den Versuchstieren wurde die Antigen-Adjuvants-Lösung subkutan injiziert.

Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere unter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen getötet und das Blut von jedem Tier separat aufgefangen. Die Blutkoagulation erfolgte bei Raumtemperatur über 1 Stunde. Um die Gerinnung zu beschleunigen, wurde das Blut mehrmals mit einem Glasstab gerührt. Anschließend erfolgte die Aufbewahrung der Gefäße mit den Blutproben über 14 Stunden bei 4 bis 8°C, damit möglichst eine große Menge Serum gewonnen werden konnte. Nach Abschluß der

Blutkuchenbildung. wurde das Serum vorsichtig dekantiert, bei 3500 U/min 20 min zentrifugiert, aliquotiert und bei -20°C eingelagert.

## **2.3. Prüfung der Antikörper auf Spezifität**

### **2.3.1. Prüfung der Spezifität der Antikörper zum Peptid-Antigen**

Für die Prüfung der Antikörper auf ihre Spezifität zu dem jeweiligen Antigen wurde für jedes der 11 Peptide ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay aufgebaut. Da die direkte Bindung der Oligopeptide an die Plaste der Mikrotiterplatte auf Grund der kurzen Aminosäuresequenz nicht zu einer Reaktion mit den Antikörpern führen kann, koppelten wir die Peptide nach der Glutaraldehyd-Konjugationsmethode (Zegers et al. 1990) an bovines Serumalbumin.

Die 11 Peptid-BSA-Konjugate wurden jeweils in einem Carbonat/Bicarbonat-Puffergemisch (pH 9,6) 1:1 000 verdünnt und in die einzelnen Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C wurde die Konjugatlösung verworfen und die Platte dreimal mit 200 µl PBS (+0,2% Tween 20) pro Kavität gewaschen. Noch freie Bindungsstellen wurden mit einer 0,25% Magermilch/0,2% Tween 20-PBS-Lösung bei Raumtemperatur abgesättigt. Den Blockprozeß brachen wir nach 90 min durch Ausschütten und dreimaliges Waschen der Platten ab. Anschließend pipettierten wir zu den an die Plaste der einzelnen Kavitäten gebundenen Peptid-Konjugate die dazugehörenden Antikörper, die zuvor 1: 300 in PBS-Lösung (+0,2% Tween 20) verdünnt wurden. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur verwarfen wir den Überstand und wuschen die Platte dreimal, wie bereits oben beschrieben. Daran im Anschluß wurden die Kavitäten mit einem Peroxidase-markierten Anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1: 8 000 beschickt. Der Abbruch der Inkubation erfolgte nach 30 min durch Verwerfen des Überstandes und durch dreimaliges Waschen. Durch Zugabe des

Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine wurde die enzymatische Reaktion der Peroxidase gestartet. Nach 15 Minuten wurde durch das Pipettieren von 100 µl 2N HCL in jede Kavität die Reaktion beendet. Die Messung der Intensität der Farbreaktion erfolgte photometrisch bei 450 nm in einem ELISA-Platten-Reader.

Tabelle 3 Mittelwerte der optischen Dichten der Antikörperreaktion zu den Peptiden

Der Nachweis der Antikörper-Antigen-Reaktion erfolgte in einem für jedes Peptid aufgebauten Test. Es kamen die gleichen Peptide zum Einsatz, die auch für die Immunisierung verwendet wurden. Für jedes Peptid wurden die Mittelwerte aus fünf Einzelbestimmungen ermittelt.

Antikörper	Mittelwert	Standard-abweichung	S.E.M.-Wert
K10	1,886	0,208	0,093
K11	1,890	0,320	0,143
K12	1,837	0,211	0,094
K13	1,975	0,367	0,164
K758	1,571	0,237	0,105
K759	1,243	0,157	0,070
K760	1,905	0,129	0,058
K761	1,224	0,173	0,077
K762	0,928	0,139	0,062
K763	1,027	0,229	0,102
K764	2,034	0,183	0,082

Wie den in der Tabelle 3 aufgelisteten Daten zu entnehmen ist, erfolgte in allen 11 Versuchsansätzen eine eindeutige Antikörper-Antigen-Reaktion. Diese guten Ergebnissen hatten wir nicht erwartet, da uns aus Versuchen mit

Peptiden anderer Proteine bekannt war, daß die Antikörperherstellung auf der Basis relativ kurzer Peptide als Antigen in Tieren äußerst schwierig ist.

### **2.3.2. Prüfung der Spezifität der Antikörper zur pankreatischen Elastase**

Um die Spezifität der hergestellten Antikörper zu überprüfen, wählten wir anti-Peptid-Antikörper gegen die Elastase 1, da diese Isoform in der Literatur am besten beschrieben ist (Büchler et al., Krause 1989, Sziegoleit et al. 1991, Scheefers-Borchel et al. 1992, Stein et al. 1996, Lucio Gullo et al. 1999).

Die pankreatische Elastase 1 besitzt, wie bereits erwähnt, eine sehr hohe Stabilität im Stuhl. Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, daß die Elastase 1-Konzentration in fäkalen Proben von Patienten mit einer schweren Pankreasinsuffizienz signifikant niedriger ist als bei gesunden Probanden. Durch einen einfachen Testaufbau wollten wir feststellen, ob dieser signifikante Unterschied von unseren Antikörpern K 10 bis K 12 in definierten Stuhlproben erfaßt werden kann. Für die Untersuchungen standen uns Stuhlproben von sechs Patienten mit einer klinisch nachgewiesenen Pankreasinsuffizienz und von sechs gesunden Probanden zur Verfügung.

Die Stuhlproben der Patienten und Probanden wurden in einer phosphatgepufferten physiologischen Kochsalzlösung extrahiert. Nach Abschluß der Sedimentation der festen Bestandteile wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und zentrifugiert. Durch Membranfiltration wurden Mikroorganismen (Bakterien, Hefen usw.) und alle Bestandteile > 200 nm entfernt.

Die gereinigten Stuhlproben wurden separat in einem Carbonat/Bicarbonat-Puffergemisch (pH 9,6) 1:50 verdünnt und mit einem Volumen von jeweils 50 µl in die einzelnen Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert. Das Puffergemisch wurde als Negativkontrolle im Test mitgeführt. Die Inkubation der Platten erfolgte über 2 h bei 37°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Lösungen verworfen und die Platten dreimal mit 200 µl PBS (+0,2% Tween 20) pro Kavität gewaschen. Die noch freien Bindungsstellen in den Kavitäten wurden mittels 0,25% Magermilch/0,2% Tween 20 PBS-Lösung über 90 min

bei Raumtemperatur abgesättigt. Das Blockenvorgang beendeten wir durch Verwerfen der Lösungen und dreimaliges Waschen der Platten. Daran anschließend wurden die Kaninchenserum mit den spezifischen Peptidantikörpern in einer Verdünnung von 1: 500 (in PBS-Lösung +0,2% Tween 20) in die entsprechenden Kavitäten pipettiert. Als Negativkontrolle wurde das Serum des nicht immunisierten Tieres mitgeführt. Die Inkubation der Antikörperlösungen erfolgte über 60 min bei Raumtemperatur. Im Anschluß daran wurden die Lösungen verworfen und die Platten dreimal gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Peptidantikörper erfolgte mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörper. Das Anti-Kaninchen-IgG-POD-Konjugat wurde vor dem Auftragen 1: 8 000 in einem Kojugatverdünnungspuffer (DRG, Marburg) verdünnt. Der Abbruch der Inkubation erfolgte nach 30 min durch Verwerfen des Überstandes und durch dreimaliges Waschen. Als Substrat für die Peroxidase setzten wir pro Kavität 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine ein. Die enzymatische Reaktion wurde nach 15 min durch Zugabe von 100 µl 2N HCL pro Kavität beendet. Die Intensität der Farbreaktion bestimmten wir photometrisch in einem ELISA-Platten-Reader bei 450 nm.

Die Ergebnisse der sechs untersuchten Patienten- und Probandenproben mit den vier verschiedenen Peptidantikörpern sind in der Tabelle 4 aufgelistet.

Die Stuhlproben der gesunden Probanden zeigten mit Ausnahme der Stuhlprobe 9 in Kombination mit den Antikörpern K11 und K13 eine teilweise deutlich höhere Antigen-Antikörperreaktion als die fäkalen Proben der Patienten mit einer Pankreasinsuffizienz. Diesen ersten Versuchen können wir zwar entnehmen, daß es wahrscheinlich möglich ist, mit unseren Antikörpern eine Pankreasinsuffizienz zu erkennen, aber die Aussage, daß die Reaktion unserer Antikörper mit den Elastasemolekülen in den Stuhlproben zu den Differenzen geführt hat, kann auf keinen Fall getroffen werden. Diesen Beweis mußten wir mit anderen biochemischen Methoden erbringen.

Tabelle 4 Mittelwerte der optischen Dichten der Antikörperreaktion zu ausgewählten Stuhlproben.

Der Nachweis der Antikörper-Antigen-Reaktion erfolgte mittels auf ELISA-Platten gebundener Bestandteile sechs verschiedener Stuhlproben von Patienten mit einer Pankreasinsuffizienz und sechs verschiedener Stuhlproben von gesunden Probanden. Für jede Stuhlprobe wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus vier Einzelbestimmungen ermittelt.

	Probennr.	K 10	K 11	K 12	K 13
Pankreasinsuffizienz Patienten mit	1	0,49 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,08
	2	0,41 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,03
	3	0,46 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,02
	4	0,44 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,06	0,47 $\pm$ 0,08	0,23 $\pm$ 0,04
	5	0,70 $\pm$ 0,05	0,64 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,04
	6	0,69 $\pm$ 0,07	1,16 $\pm$ 0,07	0,85 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,06
Pankreasinsuffizienz Probanden ohne	7	2,30 $\pm$ 0,05	1,97 $\pm$ 0,05	1,56 $\pm$ 0,02	1,77 $\pm$ 0,06
	8	1,28 $\pm$ 0,04	1,19 $\pm$ 0,05	1,54 $\pm$ 0,04	1,08 $\pm$ 0,03
	9	1,20 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,02	1,39 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,04
	10	1,43 $\pm$ 0,08	1,21 $\pm$ 0,08	1,55 $\pm$ 0,08	1,02 $\pm$ 0,04
	11	1,96 $\pm$ 0,07	1,60 $\pm$ 0,08	1,95 $\pm$ 0,14	1,27 $\pm$ 0,06
	12	2,31 $\pm$ 0,09	2,39 $\pm$ 0,04	2,30 $\pm$ 0,08	2,11 $\pm$ 0,05

Da es nicht möglich ist, humane pankreatische Elastase 1 kommerziell zu erwerben, versuchten wir, mit den uns zur Verfügung stehenden definierten Stuhlproben die Antikörper K 10 und K 12 auf ihre Spezifität zur Elastase 1 zu untersuchen. Wir koppelten den Antikörper K 12 nach der Methode von Holzhauer (1995) an ein Bromcyan-aktiviertes Gel. Mit ungefähr 2ml des Antikörper tragenden Gels füllten wir eine Säule. Die Säule wurde mit 50 ml PBS (pH 7,8) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min gewaschen. Daran anschließend wurden 2 ml Überstand einer extrahierten Stuhlprobe eines

gesunden Probanden mit PBS 1:2 verdünnt und mit der gleichen Fließgeschwindigkeit über die Säule gepumpt. In der Säule noch enthaltene, aber nicht gebundene Proteine wurden mit einem 0,5 M NaCl/50 mM Na-Phosphat-Puffergemisch (pH 7,8) so lange ausgewaschen, bis die UV-Absorption bei 280 nm kleiner 0,01 (1 cm Lichtweg) war. Eluiert wurden die gebundenen Proteine mit einem 0,1 M Na-Citrat-Puffer (pH 3,0). Die Fraktion mit einer Absorption  $A_{280}^{1\text{ cm}} > 0,2$  wurde aufgefangen und mit 1 N NaOH neutralisiert. Anschließend wurde die Säule mit 60 bis 75 ml PBS (pH 7,8) regeneriert. Das Eluat wurde dreimal 2 h gegen PBS mit einem 100-fachen Volumenüberschuß bei Raumtemperatur dialysiert. Der Proteinlösung wurden 0,02% Thiomersal zugesetzt, portioniert und bei 4 bis 8°C aufbewahrt.

Den Proteingehalt des Eluats bestimmten wir photometrisch.

Die affinitätschromatographisch gereinigte Stuhlprobe wurde im SDS-Gel nach der Molekulargröße aufgetrennt. Dazu wurde die Probe mit Probenpuffer 1:2 verdünnt (3,125 g 1M Tris/HCL pH 6,8; 1,0 g SDS; 18,8 g Glycin auf 1l Aqua bidest). Die Proteinauftrennung erfolgte unter folgenden konstanten Bedingungen: 300 V, 50 mA, 11W bei 15°C.

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran (0,45 µm, Schleicher & Schüll) erfolgte im Semi-Dry-Verfahren mit der Transblot-Apparatur (Cti-GmbH, Idstein) unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems. Der Aufbau der von uns eingesetzten Transblot-Apparatur ist in der Abbildung 2 schematisch dargestellt. Nach Ablauf der Transferzeit wurde die Membran 5 min in Ponceau S gefärbt und anschließend in Aqua bidest differenziert, um die Bloteffizienz überprüfen und die geeigneten Bereiche für die Detektion herausschneiden zu können. Mit Ausnahme der Inkubation der Membran in der Erstantikörperlösung, welche bei 4°C erfolgte, wurden alle nun folgenden Wasch- und Inkubationsschritte unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt.

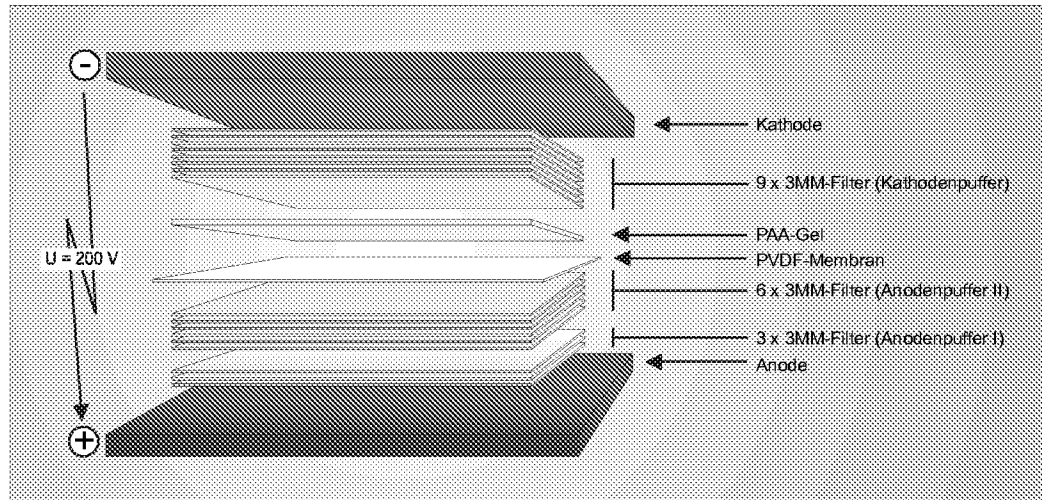


Abb. 2 Schematische Darstellung des Aufbaus der Transblot-Apparatur

Die geblottete Membran wurde einmal 10 min in TBST (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20) gewaschen, bevor sie für 2 h in Blockierungslösung (5% Magermilchpulver in TBST) inkubiert wurde. Die Peptid-Antikörper K 10 und K 12 wurden 1:100 in TBST (+5% Magermilchpulver) verdünnt. In die jeweilige Erstantikörperlösung wurde die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen dreimal jeweils 10 min in TBST gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation über 2 h mit einem Anti-rabbit-POD-Konjugat (Verdünnung 1:1 000 in TBST). Nach Ablauf der Zeit wurden die Membranen wiederum dreimal 10 min in TBST gewaschen, bevor sie für 10 bis 20 min in die Substratlösung (10 mM Ammoniummolybdat in PBS; 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Harnstoff-Addukt; 1,2 mg/ml Tetramethylbenzidin in Ethanol, wurden im Volumenverhältnis 4:5:1 frisch gemischt) überführt wurden. Die Blotting-Membran wird auf Filterpapier gelegt und an der Luft getrocknet.

Die in der Abbildung 3 dargestellten Blots zeigen, daß beide getesteten Antikörper ein fast identisches Proteinmuster erkennen lassen. Besonders deutlich wird ein Protein mit der Molmasse 28 kD vom Antikörper K 12



angezeigt. Da die Molmasse mit der des Elastase 1-Moleküls übereinstimmt, können wir mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, daß der Antikörper K 12 die humane fäkale Elastase bindet. Die von beiden Antikörpern bei der Molmasse um 25 kD angezeigten diffusen Banden sind wahrscheinlich auf die Glykobestandteile des Elastasemoleküls zurückzuführen. Aus der Literatur ist bekannt, daß Glykoproteine, zu denen auch die Elastase gehört, bei der Denaturierung mit SDS unregelmäßig mit diesem Molekül beladen werden können und daß daraus eine nicht reguläre Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine in der Elektrophorese resultieren kann, wodurch dann scheinbar andere Molmassen im Western Blot angezeigt werden (Holtzhauer 1996, Görg und Westermeier 1998). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, daß es sich bei dem von den Antikörpern gebundenen Protein um Elastase handelt.

Die in beiden Blots erkennbaren Proteinbanden mit einer Molmasse von ca. 50 KD sind wahrscheinlich dimere Formen der Elastase 1, die durch den hohen Anteil hydrophober Aminosäuren der Elastase (ca. 30%) entstanden sind. Eher auszuschließen ist, daß die Antikörper K 10 und K 12, die gegen unterschiedliche Peptidsequenzen der Elastase gerichtet sind, gemeinsam ein anderes Protein mit der gleichen Molmasse unspezifisch erkennen.

Das mit einer Molmasse von ca. 10 kD detektierte Protein ist ein während der Darmpassage durch Proteolyse entstandenes Bruchstück der Elastase, das von beiden Antikörpern erkannt wird.

Wenn sich unsere Beobachtungen durch spätere Untersuchungen bestätigen, dann haben unsere Antikörper den Vorteil, daß nicht nur das Elastase 1-Molekül, sondern auch dimere Formen und Bruchstücke des Moleküls erkannt werden können, so daß daraus eine Erhöhung der Sensitivität unserer Untersuchungsmethode möglich wäre.

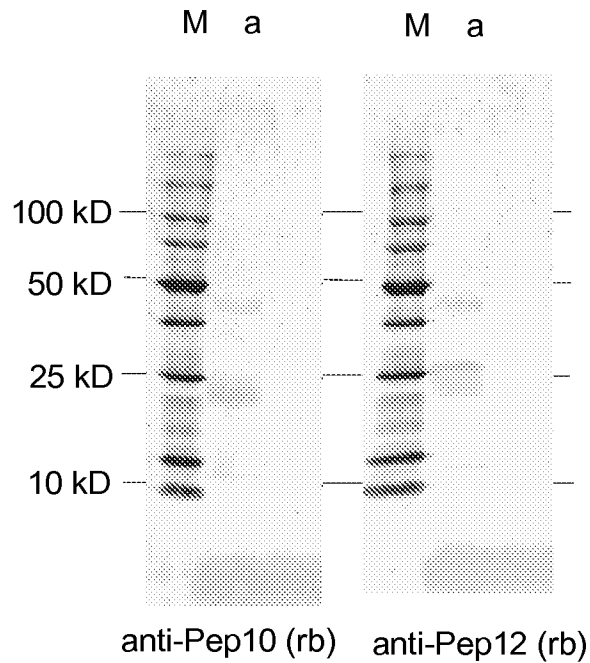


Abb. 3 Nachweis der Spezifität der Antikörper K 10 und K 13

SDS-PAGE nach Laemmli, 5 -> 20 % T, Western-Blot nach Kyhse-Andersen auf PVDF, Marker-Enzym POD, Farbsubstrat Seramun Blue precipitating, Molmassenstandard BioRad Precision streptactin.

M – Molmassenstandards, a – affinitätschromatographisch gereinigte humane Elastase aus Stuhl

## 2.4. Reinigung der Antikörper

Nachdem wir mit hoher Wahrscheinlichkeit festgestellt hatten, daß die Antikörper K 10 und K12 die pankreatische Elastase E 1 als Antigen erkennen und binden können, wurden die Antikörper nach einer modifizierten Methode von Harlow (1988) affinitätschromatographisch an Protein A gereinigt. Für die

Antikörperreinigung wurde eine Säule, die mit Protein A Sepharose (Pharmacia, Freiburg) gefüllt war und ein Gelvolumen von 4 bis 5 ml (15 x 22,5 bzw. 15 x 28,3 mm) besaß, eingesetzt. Die Säule wurde mit 50 ml PBS (pH 7,8) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min gewaschen. 2 bis 5 ml des zu reinigenden Kaninchen-Antiserums wurden mit PBS 1:2 verdünnt und mit der gleichen Fließgeschwindigkeit über die Säule gepumpt. In der Säule noch enthaltene, aber nicht gebundene Proteine wurden mit einem 0,5 M NaCl/50 mM Na-Phosphat-Puffergemisch (pH 7,8) so lange ausgewaschen, bis die UV-Absorption bei 280 nm kleiner 0,01 (1 cm Lichtweg) war. Eluiert wurden die gebundenen Antikörper mit einem 0,1 M Na-Citrat-Puffer (pH 3,0). Die Fraktion mit einer Absorption  $A_{280}^{1\text{ cm}} > 0,2$  wurde aufgefangen und mit 1 N NaOH neutralisiert. Anschließend wurde die Säule mit 60 bis 75 ml PBS (pH 7,8) regeneriert. Das Eluat wurde dreimal 2 Stunden gegen PBS mit einem 100-fachen Volumenüberschuß bei Raumtemperatur dialysiert. Der Antikörperlösung wurden 0,02% Thiomersal zugesetzt, portioniert und bei 4 bis 8°C aufbewahrt.

Den IgG-Gehalt des Eluats bestimmten wir photometrisch.

## **2.5. Auswahl und Beschichten der ELISA-Platten**

Wir untersuchten ELISA-Platten der Firmen Greiner Labortechnik GmbH Frickenhausen, Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden und Labsystems Helsinki auf ihre Eignung für unser Testsystem. Von Greiner und Nunc standen uns Platten mit niedriger (200 ng/cm<sup>2</sup>) und mittlerer Bindungskapazität (600 ng/cm<sup>2</sup>) zur Verfügung. Von Labsystems verwendeten wir die ELISA-Platten mit mittlerer Bindungskapazität. Alle Platten waren mit Streifen, die jeweils acht Kavitäten enthielten, vormontiert. Die Vertiefungen hatten einen flachen Boden. Die Kavitäten der Platten von Greiner und Labsystems waren einzeln brechbar.

Die Platten wurden mit dem Antikörper, der gegen das Peptid 10 gewonnen wurde, beschichtet. Als Beschichtungspuffer verwendeten wir vier

verschiedene Puffersysteme. Bei der Auswahl der Puffer mußte beachtet werden, daß die optimale Bindungskapazität der polyklonalen Antikörper bei unterschiedlichem pH-Milieu liegen kann. Im sauren pH-Bereich setzten wir ein 0,2 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  / 0,1 M  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$   $\cdot$   $\text{H}_2\text{O}$ -Puffergemisch (pH 3,2) ein. Für den neutralen pH-Bereich verwendeten wir ein 0,1 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  / 0,1 M  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$   $\cdot$   $\text{H}_2\text{O}$ -Puffergemisch (pH 6,2) und ein 0,15 M NaCl / 0,02 M Tris-Puffergemisch (pH 7,6). Im basischen pH-Bereich verdünnten wir die Antikörper in einem 0,15 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  / 0,035 M  $\text{NaHCO}_3$ -Puffergemisch (pH 9,6).

Nach der 2-stündigen Inkubation bei 36,5°C wurden die Platten mit einer 0,25%-igen Magermilch/0,2%-igen Tween 20 PBS-Lösung über 90 min bei Raumtemperatur geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden sieben Proben mit unterschiedlichem Elastasegehalt und der Probenverdünnungspuffer als Blindwert 12-mal aufgetragen. Die Inkubation der Proben (60 min bei Raumtemperatur) wurde durch Verwerfen der Überstände und dreimaliges Waschen der Platten beendet. Als zweiten Antikörper verwendeten wir den mit Biotin-konjugierten Antikörper K 12 in einer Verdünnung von 1:600. Nach 30 min wurde die Lösung mit den nicht gebundenen Antikörpern verworfen und die Mikrotiterplatten wurden wieder dreimal gewaschen. Als Enzym verwendeten wir an Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase (Boeringer, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10 000. Die Inkubation des Enzymkonjugates erfolgte wiederum über 30 min bei Raumtemperatur. Nach dem Verwerfen des Überstandes und dem Waschprozeß wurden 100 µl TMB als Substrat für die Peroxidase in die einzelnen Kavitäten pipettiert. Nach 20 min wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl 2N HCl pro Kavität beendet. Die Messung der Intensität der Farbreaktion wurde photometrisch in einen ELISA-Platten-Reader bei 450 nm durchgeführt.

Die Mikrotiterplatten mit hoher Bindungskapazität von Greiner und Nunc erwiesen sich bei den vier verschiedenen Beschichtungspuffern auf Grund der sehr hohen Blindwerte (OD-Werte von 1,24 bis 3,08) für unsere Aufgabenstellung als ungeeignet. Die Konzentration der Proteine in unserem

Blockpuffer erwies sich als viel zu gering, um die nach der Kopplung der spezifischen Antikörper an die Plaste noch freien Bindungsstellen zu blocken. Eine Erhöhung des Proteingehalts in der Blocklösung verstärkte die Kreuzreaktivität des Detektionsantikörpers.

Von den vier eingesetzten Beschichtungspuffern erwies sich das 0,15 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  / 0,035 M  $\text{NaHCO}_3$ -Puffergemisch (pH 9,6) bei den Mikrotiterplatten mit mittlerer Bindungskapazität als am besten geeignet, um den Antikörper K10 an die Plaste der Kavitäten zu binden. Bei der Verwendung des 0,2 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  / 0,1 M  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Puffergemisches (pH 3,2) wurden im Vergleich zum basischen System weniger Antikörper in den Kavitäten gebunden (Greiner 62%, Nunc 69% und Labsystem 75%). Der Einsatz der beiden Puffersysteme des neutralen pH-Bereichs brachten zwar ähnlich hohe Bindungskapazitäten des Antikörpers K10 an die Plaste wie das basische Puffersystem, allerdings lagen die Blindwerte bei allen drei Herstellern über der optischen Dichte von 0,3 (0,36 bis 0,51).

Auf Grund dieser Ergebnisse entschlossen wir uns, die weitere Testentwicklung mit dem basischen Puffersystem durchzuführen. In der Tabelle 5 sind die mit dem 0,15 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  / 0,035 M  $\text{NaHCO}_3$ -Puffergemisch (pH 9,6) erzielten OD-Werte der Mikrotiterplatten mit mittlerer Bindungskapazität von den drei Herstellern aufgelistet.

Die von uns getesteten Mikrotiterplatten mit mittlerer Bindungskapazität der Hersteller Greiner, Nunc und Labsystems zeigten bei der Beschichtung mit dem Antikörper K10 (gelöst in 0,15 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  / 0,035 M  $\text{NaHCO}_3$ -Puffergemisch, pH 9,6) eine sehr geringe Varianz. Die Platten der Firma Greiner hatten mit der optischen Dichte von 0,247 (0,235 bis 0,255) den höchsten Hintergrund und bei der Probenbestimmung die geringsten Werte. Der Hintergrund bei den Mikrotiterplatten der Firma Nunc lag zwar in diesem Versuch mit einer optischen Dichte von 0,175 (0,167 bis 0,186) unter dem bei ELISA-Systemen angestrebten Wert von 0,2, war allerdings dreimal so hoch wie der Wert 0,059 (0,050 bis 0,068) bei den Platten von Labsystems. Die optischen Dichten der Proben waren bei Nunc am höchsten.

Der sehr niedrige Hintergrund bei den Mikrotiterplatten von Labsystems war ausschlaggebend, daß wir die weitere Testentwicklung mit diesen Platten durchführten.

Tabelle 5 ELISA-Plattenvergleich verschiedener Hersteller

Verglichen wurden ELISA-Platten mit mittlerer Bindungskapazität der Hersteller Greiner Labortechnik GmbH Frickenhausen, Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden und Labsystems Helsinki.

Für jede Probe wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 12 Einzelbestimmungen ermittelt.

	Labsystems	Nunc	Greiner
Blank	0,059 $\pm$ 0,002	0,175 $\pm$ 0,003	0,247 $\pm$ 0,003
Probe 1	1,388 $\pm$ 0,008	1,578 $\pm$ 0,017	1,068 $\pm$ 0,011
Probe 2	1,786 $\pm$ 0,027	1,951 $\pm$ 0,029	0,918 $\pm$ 0,006
Probe 3	1,649 $\pm$ 0,018	1,642 $\pm$ 0,014	1,361 $\pm$ 0,008
Probe 4	2,604 $\pm$ 0,028	3,092 $\pm$ 0,052	1,836 $\pm$ 0,007
Probe 5	0,286 $\pm$ 0,009	0,378 $\pm$ 0,007	0,342 $\pm$ 0,003
Probe 6	2,236 $\pm$ 0,026	2,870 $\pm$ 0,024	1,283 $\pm$ 0,023
Probe 7	2,626 $\pm$ 0,021	3,225 $\pm$ 0,030	2,308 $\pm$ 0,017

## 2.6. Ermitteln des Referenzbereiches

Der Referenzbereich für die Untersuchungsmethode wurde anhand von 146 Stuhlproben gesunder Probanden, die nachweislich keine Pankreasinsuffizienz hatten, und von 98 fäkalen Proben von Patienten mit einer nachgewiesenen Pankreasinsuffizienz ermittelt. Die Insuffizienz bei den Patienten wurde mit den in Kliniken eingesetzten bildgebenden Verfahren diagnostiziert. Bei 36 Patienten wurde zusätzlich eine Bestimmung des Chymotrypsins im Stuhl (Chymotrypsin Kinetiktest von Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt.

Die Stuhlproben der beiden Versuchsgruppen wurden jeweils zweimal als Doppelbestimmung mit unserer Bestimmungsmethode untersucht. Die Verteilung der Mittelwerte der Proben sind in der Abbildung 4 dargestellt.

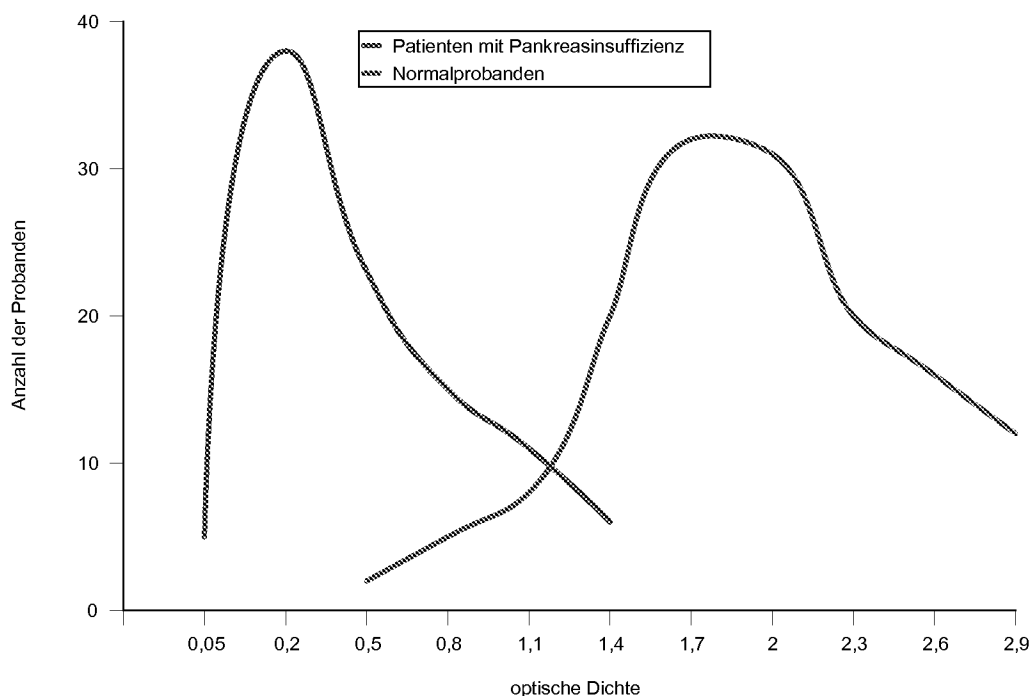


Abb. 4 Vorläufiger Referenzwert

Der vorläufige Referenzwert bei der optischen Dichte von 1,0 wurde anhand von 146 gesunden Probanden und 98 Patienten mit einer sicher diagnostizierten Pankreasinsuffizienz ermittelt. Die dargestellten Mittelwerte der Proben ergeben sich aus zwei Doppelbestimmungen der jeweils untersuchten Stuhlproben.

Bei einer optischen Dichte von 1,0 lagen 91% der Patienten mit einer Pankreasinsuffizienz unter diesem Wert und 92% der gesunden Probanden über diesem. Der OD-Wert 1,0 wurde von uns als vorläufiger Referenzwert definiert, der in später geplanten, umfangreichen Studien noch bestätigt werden mußte. Den Untersuchungen von Löhr (1998) und Klör (1998) folgend, ordneten wir unserem Referenzwert den Absolutwert von 200 µg Elastase/g Stuhl zu.

## **2.7. Biologische Standards**

Als biologische Standards verwendeten wir Stuhlproben von gesunden Probanden. Wir wollten durch den Einsatz von Stuhl als Standardmaterial erreichen, daß das eingesetzte Material den zu untersuchenden Proben möglichst nahe kommt. Die Stuhlproben wurden extrahiert und anschließend bei 4°C mit 12.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, steril filtriert und inaktiviert.

Die Proben wurden mit PBS bzw. 50 mM Tris/ 100 mM NaCl-Puffergemisch auf den Referenzwert von 200 µg Elastase/g Stuhl eingestellt. Die anderen Konzentrationen der Standardkurve wurden ebenfalls durch entsprechende Verdünnungen hergestellt. Der Meßbereich unserer Bestimmungsmethode der fäkalen Elastase lag zwischen 15 und 500 µg Elastase/g Stuhl.

Durch die Zugabe der Zucker Lactose bzw. Saccharose in verschiedenen Konzentrationen sollte eine Stabilisierung der Elastase in den Standards erreicht werden.

Um eine Proteolyse der Elastase durch noch enthaltene Proteasen zu verhindern, wurde den Puffern 0,01% EDTA zugesetzt. Mit der Zugabe von 0,02% Natriumazid sollte eine weitere Erhöhung der Stabilität der Standards erreicht werden. Die Standards wurden portioniert und bei 4 bis 8°C gelagert. In den ersten vier Wochen erfolgte eine wöchentliche Kontrolle auf Stabilität. Dann wurden die Untersuchungen im 14-Tagerhythmus durchgeführt. Um auch im späteren Verlauf unserer Untersuchungen Standards herstellen zu



können, die mit dem ermitteltem Referenzwert konform sind, wurde eine Probenstandardgruppe von definierten Proben zusammengestellt. Von den 16 fäkalen Proben hatten vier eine Elastasekonzentration unter 100 µg Elastase 1/g Stuhl, bei acht Proben lagen die Werte um den Referenzwert (160 bis 230 µg Elastase 1/g Stuhl), und bei den vier anderen Stuhlproben ermittelten wir einen Elastase 1-Wert über 400 µg/g Stuhl. Bei jeder Herstellung der Standardreihe wurden die Werte so eingestellt, daß die Elastasekonzentrationen der Standards den Werten der Probenstandardgruppe bei einer Toleranz von 5% entsprachen.

Die Untersuchungen zur Stabilität der Standards über einen Zeitraum von 21 Wochen zeigten, daß durch den Zuckerzusatz in den Standardpuffern zwar eine Erhöhung der Haltbarkeit erreicht werden konnte, aber wie der Tabelle 5 zu entnehmen ist, kam es bereits in der ersten Woche zum Abfall der Standardwerte, der sich dann über den gesamten Zeitraum stetig fortsetzte. Den geringsten Abfall der Werte beobachteten wir bei einem Zusatz von 1% Lactose in der Standardlösung, aber in keinem Fall war durch Zuckerzusatz eine ausreichend gute Stabilität der Proben erreichbar.

Erst durch den Einsatz von TRIS als Puffersystem und die Zugabe von 0,01 M EDTA in Kombination mit einer Lactosekonzentration von 1% wurde die Stabilität der Standards über den erforderlichen Zeitraum (> 20 Wochen) erreicht (Abb. 5). Nach Beseitigung des Haltbarkeitsproblems der Standards waren wir in der Lage, mit unserer Untersuchungsmethode über einen längeren Zeitraum reproduzierbare Meßergebnisse zu ermitteln.

Tabelle 5      Stabilisierung der Standards durch Zuckerzusatz

Den Standards wurde Lactose in unterschiedlichen Konzentrationen bzw. 1% Saccharose zugemischt. Die Untersuchungen wurden mit der Standardmethode durchgeführt. Die absoluten Werte zum Zeitpunkt  $t_0$  wurden als Referenzwerte (100%) behandelt.

Zeit in Wochen	PBS	PBS+0,5% Lactose	PBS+1% Lactose	PBS+2% Lactose	PBS+10% Lactose	PBS+1% Saccharose
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
1	93%	95%	87%	93%	88%	107%
3	86%	100%	90%	89%	81%	97%
5	79%	85%	88%	96%	90%	87%
7	71%	78%	97%	94%	83%	80%
9	57%	83%	81%	97%	95%	83%
11	40%	71%	99%	89%	80%	73%
13	36%	76%	93%	86%	84%	84%
15	29%	69%	82%	89%	74%	82%
17	27%	68%	86%	85%	77%	80%
19	21%	56%	82%	82%	69%	74%
21	20%	53%	79%	74%	68%	65%

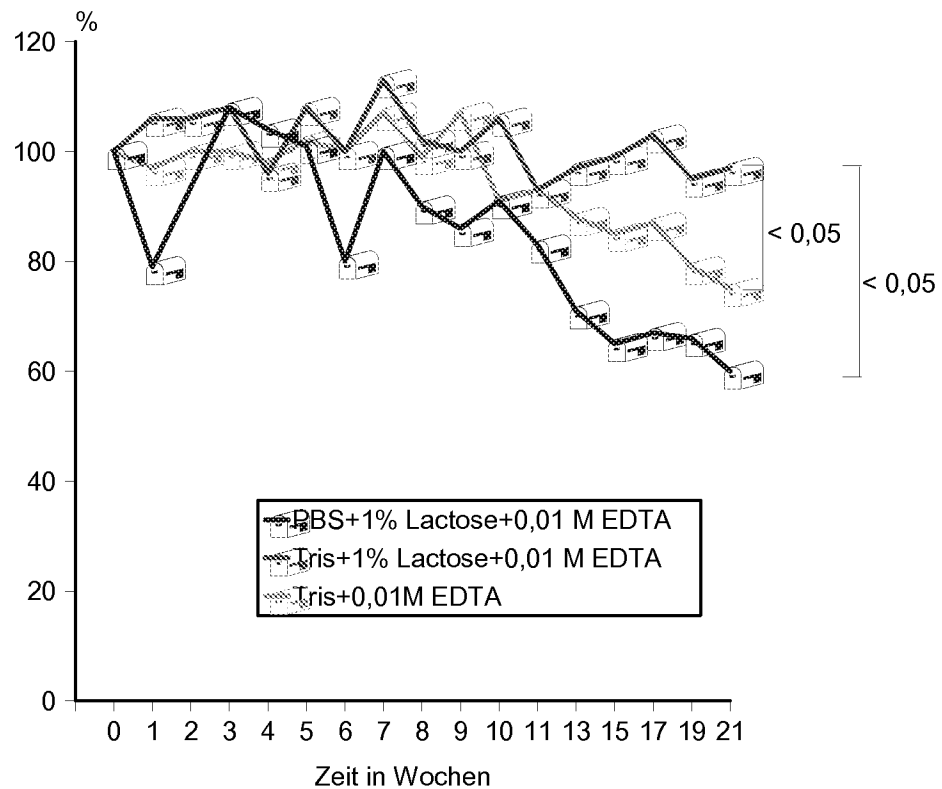


Abb. 5 Standards in verschiedenen Puffersystemen

Die Proben mit verschiedenen Elastase 1-Konzentrationen (< 100 bis 500 µg/g Stuhl) wurden in PBS+1% Lactose+0,01M EDTA, 50 mM Tris/100 mM NaCl-Puffergemisch (pH 7,6)+0,01M EDTA und 50 mM Tris/100 mM NaCl-Puffergemisch (pH 7,6)+0,01M EDTA+1% Lactose gelöst und über einen Zeitraum von 21 Wochen gelagert (4°C) und auf Stabilität geprüft.

Die Meßwerte der ersten Untersuchung wurden gleich 100% gesetzt und dienen als Bezugswert für die späteren Messungen. Die Testdurchführung erfolgte nach der vorgeschriebenen Anweisung.

## **2.8. Behandlung der fäkalen Proben**

### **2.8.1. Extraktion der Stuhlproben**

Die Extraktion der Stuhlproben ist eines der entscheidenden Kriterien für die Durchführung der Bestimmungsmethode. Nur bei genauem Einhalten der Vorschrift für die Stuhlextraktion kann eine ausreichend hohe Reproduzierbarkeit bei der Bestimmung der pankreatischen Elastase 1 in fäkalen Proben erzielt werden. Die zu extrahierenden Stuhlproben wurden unter einem Abzug auf einer digitalen Laborwaage eingewogen. Die eingewogene Stuhlmenge sollte zwischen 50 und 100 mg liegen. Die Einwaage erfolgte auf 1 mg genau. Entsprechend der gewogenen Stuhlmenge wurden pro 10 mg Stuhl 1 ml Puffer in das Probenröhrchen gegeben.

In den ersten Extraktionsversuchen konzentrierten wir uns auf die Zusammensetzung des Extraktionspuffers. Aus der Literatur war bekannt, daß dem Puffer Tenside zugesetzt werden müssen, um möglichst viel Elastase 1 der Stuhlproben in Lösung zu bringen (Krause 1989). Als Extraktionspuffer setzten wir eine phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, der wir 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1,0% und 2,0% Tween 20 bzw. 2,0% Triton x-100 beimischten, ein. Mit jedem Puffergemisch wurden zwei Stuhlproben jeweils fünfmal extrahiert. Die Extraktion der Proben wurde bei 22°C über zweimal 15 min durchgeführt. Besonders wichtig war die sehr gute Durchmischung der fäkalen Proben vor Beginn der Extraktionszeit. Nach der Sedimentation der festen Bestandteile der Stühle wurden die Elastase 1-Konzentrationen mit unserer Untersuchungsmethode bestimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Abbildung 6 dargestellt. Mit dem Zusatz von 2% Tween 20 im Extraktionspuffer wurden bis zu 20% höhere Mengen Elastase 1 aus den Stuhlproben extrahiert als mit den anderen Pufferzusätzen, so daß wir uns entschlossen, für alle weiteren Extraktionsversuche 2% Tween 20 einzusetzen.

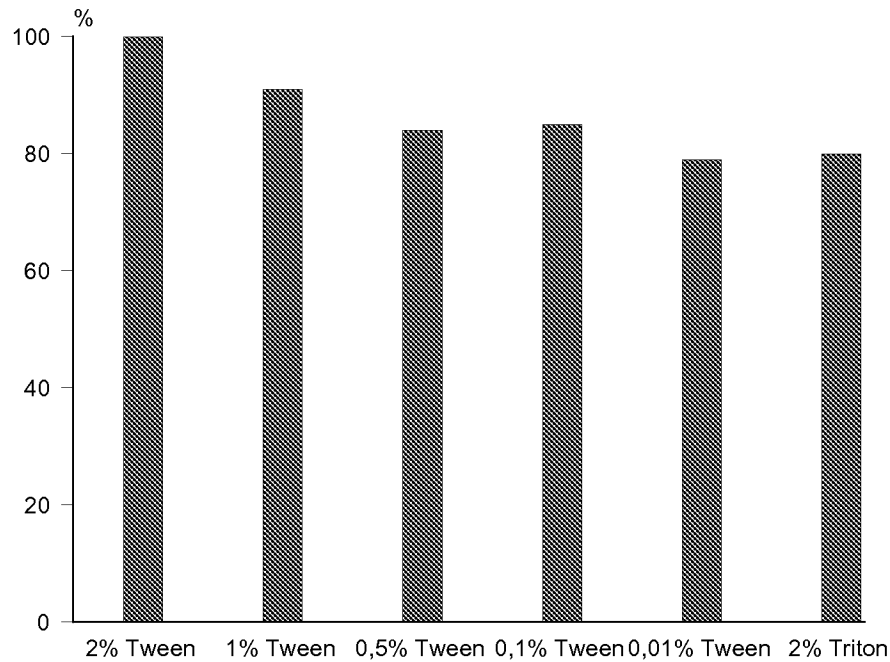


Abb. 6 Extraktion von Stuhlproben in Abhängigkeit von der Pufferzusammensetzung

Für jede Pufferzusammensetzung wurden zwei Stuhlproben mit hoher Elastase 1-Konzentration jeweils fünfmal extrahiert. Die Proben wurden bei 22°C inkubiert. Die phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung mit dem 2%-igen Tween 20 wurde gleich 100% gesetzt. Die weitere Probenbearbeitung erfolgte nach der vorgeschriebenen Methodenanweisung.

In einem anderen Versuchsansatz sollte ermittelt werden, ob die Zeit einen Einfluß auf die extrahierte Menge Elastase 1 hat. Nach der Einwaage der Stuhlproben und der Zugabe des Extraktionspuffers (PBS + 2% Tween 20) wurden die Proben 15 min, 2 h bzw. 12 h bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für jede Extraktionszeit wurden sechs Stuhlproben jeweils fünfmal im

Extraktionspuffer aufgenommen. Die Bestimmung der extrahierten Elastase erfolgte nach der Standardanweisung unserer Methode.

Den in der Abbildung 7 dargestellten Ergebnissen ist zu entnehmen, daß die Extraktionszeit einen großen Einfluß auf die extrahierte Elastase 1-Menge aus fäkalen Proben haben kann. Schon eine Verlängerung der Zeit auf zwei Stunden bewirkt einen Abfall der für die Bestimmung verfügbaren Elastasekonzentration um 30% gegenüber der kürzeren Extraktionsmethode. Nach 12 Stunden Extraktion wurde sogar weniger als die Hälfte des Ausgangswertes bestimmt. Nach diesen Untersuchungen konnten wir davon ausgehen, daß die Extraktion der Stuhlproben über 15 min mit sich anschließender nochmaliger gründlicher Durchmischung und einer 30-minütigen Sedimentationsphase die beste Methode der Probenaufbereitung darstellt.

Weiterhin sollte der Einfluß der Temperatur auf die Extraktion der Elastase 1 aus Stuhlproben untersucht werden. Für diese Versuche wurden sechs Stuhlproben mit unterschiedlichen Elastase 1-Konzentrationen jeweils fünfmal eingewogen und im Extraktionspuffer aufgenommen. Nach der gründlichen Durchmischung wurden die Proben zu gleichen Teilen in jeweils vier Röhrchen gegeben. Eine der so gebildeten Versuchsgruppen wurde nach der Standardmethode (2 min durchmischen, 15 min extrahieren, 2 min durchmischen, 30 min sedimentieren) behandelt, die anderen Gruppen wurden nach dem 2-minütigen Durchmischen bei unterschiedlichen Temperaturen (4°C, 22°C bzw. 37°C) über 12 h inkubiert. Die Bestimmung der extrahierten Elastase erfolgte nach der Standardanweisung unserer Methode.

Die in der Abbildung 8 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß bei allen Temperaturen ein Abfall der Elastase 1-Konzentration in den Stuhlproben gegenüber unserer Standardmethode zu beobachten war, wobei der größte Abfall für uns

etwas überraschend bei 22°C (44%) gemessen wurde. Der Einfluß der Temperatur auf die extrahierte Elastase 1-Menge ist sicher vorhanden, allerdings messen wir der Extraktionszeit eine größere Bedeutung bei.

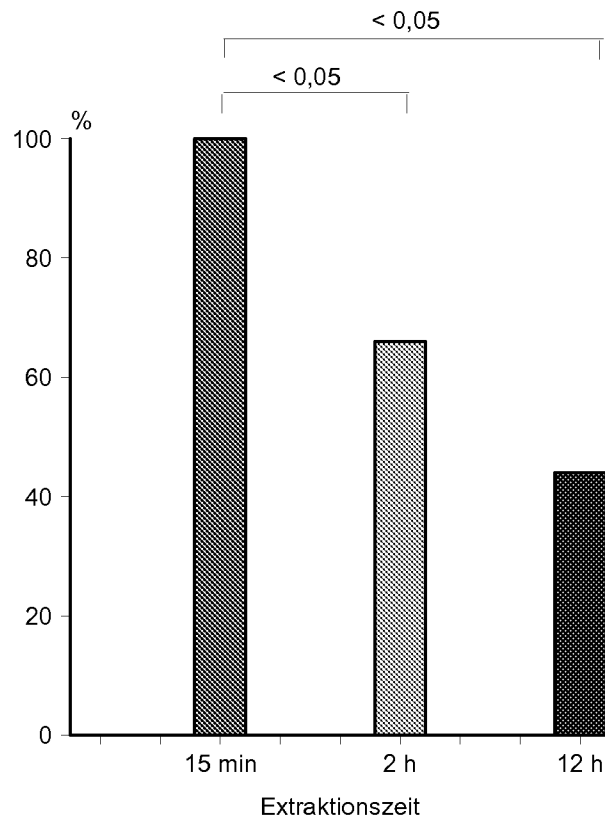


Abb. 7 Extraktion von Stuhlproben in Abhängigkeit von der Zeit

Für jede Zeit wurden sechs Stuhlproben jeweils fünfmal im Standard-Extraktionspuffer aufgenommen.

Die Proben wurden bei 22°C inkubiert.

Als Bezug diente die Standard-Extraktionsmethode (2 min vortexen, 15 min sedimentieren, 2 min vortexen, 30 min sedimentieren).

Zwei Proben hatten einen Elastasewert unter 100 µg Elastase 1/g Stuhl, zwei 100-200 µg Elastase 1/g Stuhl und zwei über 250 µg Elastase 1/g Stuhl.

Die weitere Probenbearbeitung erfolgte nach der vorgeschriebenen Methodenweisung.

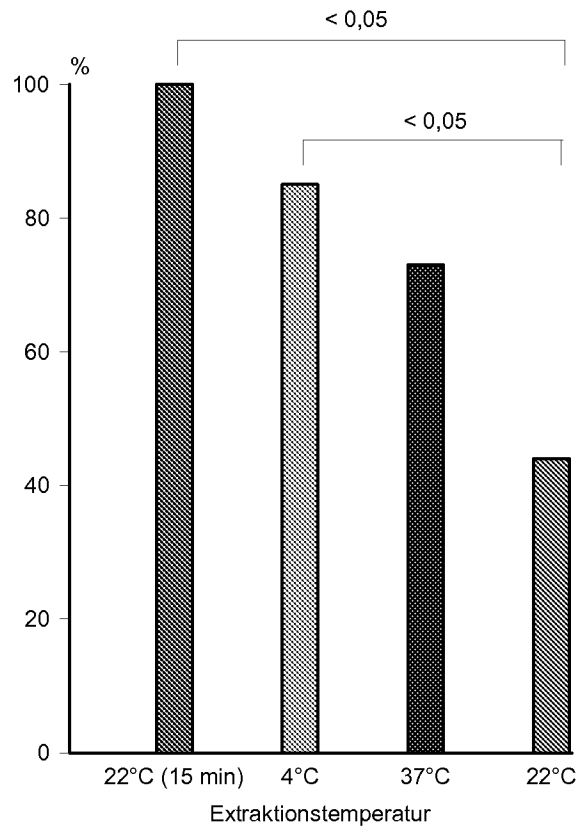


Abb. 8 Extraktion von Stuhlproben in Abhängigkeit von der Temperatur

Für jede Temperatur wurden sechs Stuhlproben jeweils fünfmal im Standard-Extraktionspuffer aufgenommen.

Die Proben wurden bei 4°C, 22°C und 37°C 12 h inkubiert.

Als Bezug diente die Standard-Extraktionsmethode (2 min vortexen, 15 min extrahieren, 2 min vortexen, 30 min sedimentieren). Zwei Proben hatten eine Elastase 1-Konzentration unter 100 µg/g Stuhl, zwei 100 bis 200 µg/g Stuhl und zwei über 200 µg/g Stuhl.

Die weitere Probenbearbeitung erfolgte nach der vorgeschriebenen Methodenweisung.



Ein weiterer Versuchsansatz sollte zeigen, ob die eingesetzte Tween 20-Menge ausreicht, um die Stuhlproben gegenüber einem mikrobiellen Abbau ausreichend zu stabilisieren. Sechs Stuhlproben wurden jeweils fünfmal extrahiert. Die gut homogenisierten Proben wurden halbiert und die eine Hälfte mit 0,2% Natriumazid versetzt.

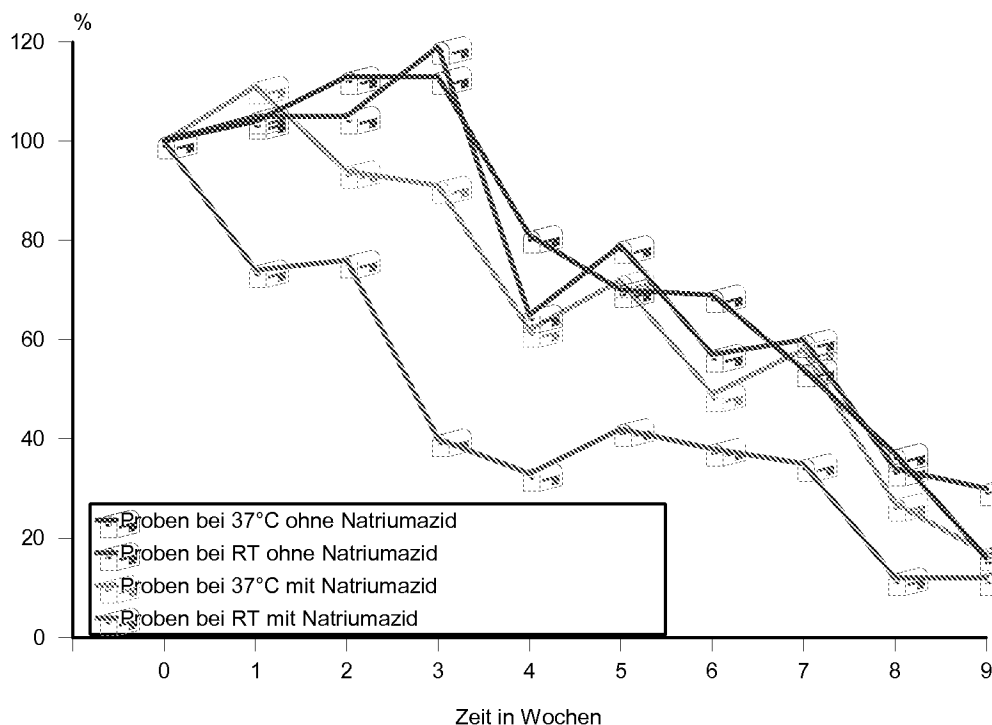


Abb. 9 Extraktion von Stuhlproben mit und ohne Natriumazid

Sechs Stuhlproben wurden jeweils fünfmal mit PBS + 2% Tween 20 extrahiert. Die Proben wurden geteilt (vier Versuchsansätze pro Probe mit ungefähr gleichen Volumina). Zwei Versuchsreihen wurden mit 0,02% Natriumazid versetzt.

Die Meßwerte der ersten Untersuchung wurden gleich 100% gesetzt und dienten als Bezugswert für die späteren Messungen. Die Inkubation der Proben erfolgte bei Raumtemperatur bzw. 36,5°C über neun Wochen.

Die Elastase 1-Bestimmung erfolgte im 7-Tage-Intervall nach der vorgeschriebenen Methodenanweisung.

Die Proben wurden nochmals halbiert. Nach der Sedimentation der festen Stuhlbestandteile wurden die Überstände abpipettiert. Die Inkubation der Überstände erfolgte bei Raumtemperatur und 36,5°C. Die Elastasebestimmung wurde wöchentlich nach der Standardanweisung unserer Methode durchgeführt.

Vom Ergebnis dieser Untersuchungen (Abb. 9) waren wir überrascht, denn der in den ersten 14 Tagen beobachtete Abfall der Elastase 1-Konzentration in den Proben, die mit 0,2% Natriumazid versetzt waren, ist uns unerklärlich. Wir erwarteten durch den Zusatz von Natriumazid eigentlich eine längere Stabilität der Elastase 1 gegenüber den unbehandelten Proben.

### **2.8.2. Verdünnung der Stuhlproben**

Die Konzentration der an die Plaste der ELISA-Platte gebundenen Antikörper und das Antikörperbiotin-Konjugat wurden so eingestellt, daß die extrahierten Stuhlproben 1: 200 verdünnt werden müssen. Als Probenverdünnungspuffer verwendeten wir eine phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS) mit 0,02% zugesetztem Tween 20. Dieser Puffer diente gleichzeitig als Waschpuffer und als Blindwert.

### **2.9. Konjugation der Antikörper mit Biotin**

Für die Konjugation des Antikörpers K 12 mit Biotin wurde ein Biotin Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) eingesetzt. Die im Kit enthaltene Biotin-7-NHS-Lösung wurde mit 250 µl DMSO versetzt und gut durchmischt. Von dieser Lösung wurden 7,6 µl pro mg Antikörper zu dem in einem ml PBS gelösten Antikörper gegeben. Der molare Ansatz betrug 1:50, so daß die Biotin-7-NHS-Lösung im Überschuß vorhanden war. Die Antikörper wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit der Biotin-Lösung inkubiert. Im Anschluß wurde das nicht gekoppelte Biotin mittels

Säulenchromatographie aus der Lösung entfernt. Das Antikörper-Biotin-Konjugat wurde bei 4 bis 8°C aufbewahrt.

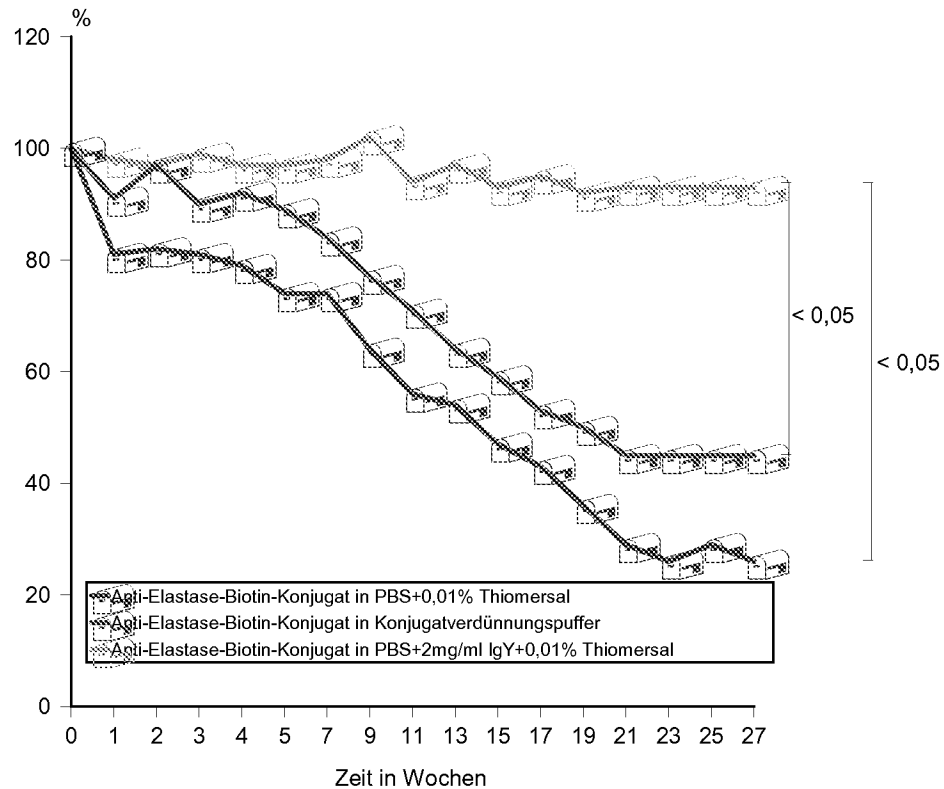


Abb. 10 Stabilität des Anti-Elastase 1-Biotin-Konjugates

Fünf Anti-Elastase 1-Biotin-Konjugate (Antikörper K 14-Biotin) wurden in den Puffersystemen PBS + 0,01% Thiomersal, Konjugatverdünnungspuffer (DRG, Marburg) und PBS + 2 mg/ml IgY + 0,01% Thiomersal über einen Zeitraum von 27 Wochen auf Stabilität getestet (ersten vier Bestimmungen wöchentlich, dann im 14-Tage-Rhythmus).

Die Meßwerte der ersten Untersuchung wurden gleich 100% gesetzt und dienen als Bezugswert für die späteren Messungen. Die anderen Bestandteile der Bestimmungsmethode wurden als Charge hergestellt und konnten somit als konstante Größen betrachtet werden.

Um mit dem Antikörper-Biotin-Konjugat effektiv arbeiten zu können, machte sich eine Vorverdünnung erforderlich. Die Konzentration des Konjugats wurde immer so eingestellt, daß es bei Durchführung der Untersuchungen nach Standardanweisung 1: 200 verdünnt werden mußte.

Um die Vorverdünnung über eine längere Zeit stabil halten zu können, versetzten wir das Antikörper-Biotin-Konjugat mit einem Konjugatverdünnungspuffer (DRG, Marburg) bzw. einer phosphatgepufferten physiologischen Kochsalzlösung, der wir 2 mg/ml IgY zusetzten. Die Hühnerantikörper gewannen wir aus dem Dotter von Eiern, die von unter SPF-Bedingungen gehaltenen Hühnern stammten. Die Dotter wurden mit einer 10%-igen Dextransulfatlösung entfettet und dann zweimal mit Ammoniumsulfat gefällt (Gippner-Steppert et al. 1999).

Wie der Abbildung 10 zu entnehmen ist, konnten wir mit der Zugabe von 2 mg IgY pro ml Antikörperkonjugat eine Stabilität der Lösung über mindestens 27 Wochen erreichen.

## **2.10. Streptavidin-Peroxidase-Konjugat**

Zum Nachweis des an das Elastase 1-Molekül gebundenen biotinylierten Antikörper K 12 setzten wir in unserer Untersuchungsmethode ein Streptavidin-POD-Konjugat (Boehringer, Mannheim) ein. Das Streptavidin wird von dem an den Antikörper gekoppelten Biotin mit einer sehr hohen Affinität gebunden. Der gesamte Komplex (an die feste Phase gebundener Antikörper K 10 – Elastasemolekül – Antikörper-K 12-Biotin – Streptavidin) wird durch die an das Streptavidin gebundene Peroxidase meßtechnisch erfaßbar gemacht. Die von dem Enzym Peroxidase in einer definierten Zeit umgesetzte Substratmenge (3,3',5,5' - Tetramethylbenzidin) ist proportional der gebundenen Elastase 1.

Wie bei den anderen Bestandteilen unserer Bestimmungsmethode mußte auch für das Streptavidin-POD-Konjugat eine Stabilität über mindestens 25

Wochen gewährleistet sein. Wie in der Abbildung 11 dargestellt, wurde dieses Kriterium durch das Lösen des Konjugats in einem Konjugatverdünnungspuffer (DRG, Marburg) erfüllt.

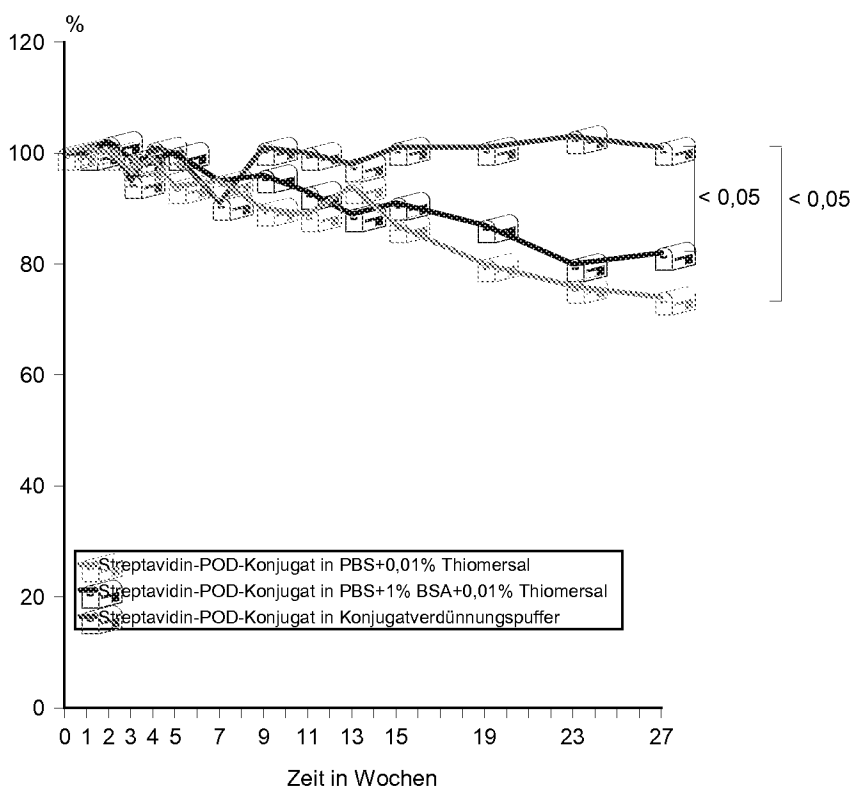


Abb. 11 Stabilität des Streptavidin-POD-Konjugates

Fünf Streptavidin-POD-Konjugate (Boehringer Mannheim) wurden in den Puffersystemen PBS + 0,01% Thiomersal, Konjugatverdünnungspuffer (DRG, Marburg) und PBS + 1% BSA + 0,01% Thiomersal 1 : 10 000 verdünnt und über einen Zeitraum von 27 Wochen auf Stabilität getestet (die ersten fünf Bestimmungen wöchentlich, dann im 14-Tage-Intervall).

Die Meßwerte der ersten Untersuchung wurden gleich 100% gesetzt und dienten als Bezugswert für die späteren Messungen.

Die anderen Bestandteile der Bestimmungsmethode wurden als Charge hergestellt und konnten somit als konstante Größen betrachtet werden.

## 2.11. Parameter unserer Untersuchungsmethode

Im Ergebnis der bisher durchgeführten Untersuchungen werden für unsere

Methode zur Bestimmung der humanen pankreatischen Elastase 1 in Stuhlproben folgende Bedingungen definiert.

Die Extraktion der Elastase 1 aus fäkalen Proben erfolgt mit einer phosphat-gepufferten physiologischen Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 2% Tween 20 nach einem definierten Zeitregime (2 min durchmischen, 15 min extrahieren, 2 min durchmischen, 30 min sedimentieren).

Die Kavitäten der ELISA-Platten (Labystems, Helsinki) werden mit dem im Karbonat/Bikarbonat-Puffergemisch (pH 9,6) gelösten Antikörper K 10 (50 µl/Kavität) beschickt und über 2 Stunden bei 36,5°C inkubiert. Durch Verwerfen der Lösung und dreimaliges Waschen der Kavitäten mit PBS + 0,02 % Tween 20 wird die Inkubationszeit beendet. Die noch freien Bindungsstellen werden mit einer 0,25% Magermilch/0,2% Tween 20-PBS-Lösung (200 µl/Kavität) über 90 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Der Prozeß wird durch das Dekantieren der Lösung und dreimaliges Waschen abgeschlossen. Die Standards (gebrauchsfertig, in 50 mM Tris/100 mM NaCl-Puffergemisch (pH 7,6)+0,01M EDTA+1% Lactose) und die extrahierten Stuhlproben (1:200 im Waschpuffer verdünnt) werden mit einem Volumen von 50 µl in die jeweiligen Kavitäten pipettiert und über 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch Ausschütten der Lösungen und dreimaliges Waschen. Das Antikörper-(K 12)-Biotin-Konjugat (stabilisiert mit 2 mg IgY/ml Tris) wird 1:200 im Waschpuffer verdünnt und in die Kavitäten (50 µl/Kavität) gegeben. Die anschließende Inkubation bei Raumtemperatur wird nach 30 min durch Verwerfen der Lösung und dreimaliges Waschen beendet. Das gebrauchsfertige Streptavidin-POD-Konjugat (in Konjugatverdünnungspuffer, DRG, Marburg) wird mit einem Volumen von 50 µl pro Kavität aufgetragen und über 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Prozeß wird wiederum durch Dekantieren der Lösung und dreimaliges Waschen abgeschlossen. Vom Substrat (3,3',5,5' - Tetramethylbenzidin) werden 100 µl in die einzelnen Kavitäten gegeben. Der Abbruch der enzymatischen Reaktion erfolgt nach 20 min durch Zugabe von 100 µl 2 N HCl

pro Kavität. Die Intensität der Reaktion wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die Elastasekonzentrationen der Stuhlproben werden aus der aus den mitgeführten Standards errechneten Standardkurve abgelesen (Abb. 12).

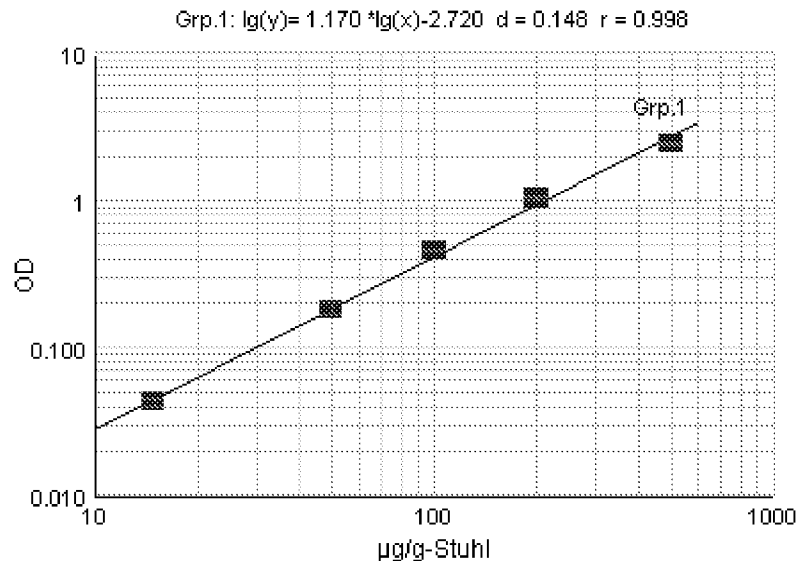


Abb. 12 Standardkurve

Typische Standardkurve, ermittelt aus den in der Untersuchungsmethode mitgeführten Standards (log-log-Darstellung)

Ein wichtiges Kriterium unserer Untersuchungsmethode sollte die Stabilität aller Bestandteile des Systems über einen Zeitraum von mindestens 25 Wochen sein. Für die Untersuchungen auf Haltbarkeit unserer Bestimmungsmethode wurden fünf Chargen mit jeweils 30 kompletten Testsystemen an unterschiedlichen Tagen hergestellt. Die Prüfung der Haltbarkeit erfolgte im Abstand von jeweils 14 Tagen. Die acht eingesetzten Stuhlproben wurden vor Beginn der ersten Untersuchung nach der Standardmethode extrahiert, die Überstände wurden portioniert und bei – 20°C eingelagert. So konnten wir gewährleisten, daß für jede Elastase 1-

Messung das gleiche Ausgangsmaterial zur Verfügung stand. Die Untersuchungen wurden nach der Standardanweisung durchgeführt. Die Ergebnisse der Langzeituntersuchungen der fünf Chargen sind in der Abbildung 13 dargestellt.

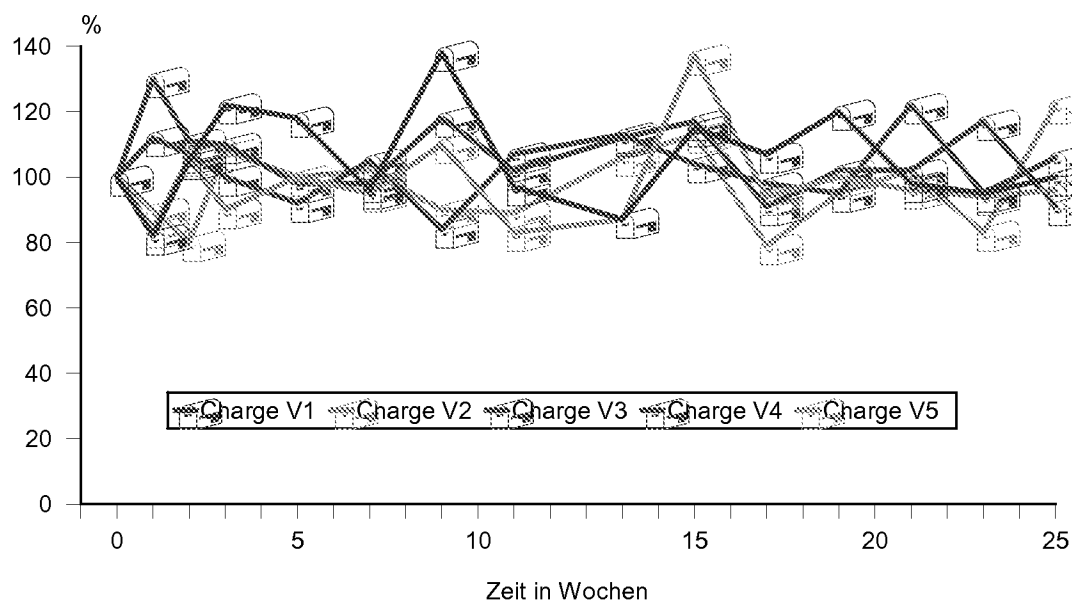


Abb. 13 Stabilitätsuntersuchungen aller Bestandteile der Bestimmungsmethode

Untersucht wurden fünf zu unterschiedlichen Zeiten hergestellte komplette Chargen der Bestimmungsmethode (Stückzahl pro Charge 30) über einen Zeitraum von 25 Wochen (die ersten drei Bestimmungen wöchentlich, dann im 14-Tage-Intervall).

Als Untersuchungsmaterial dienen acht Stuhlproben, die vor Beginn der Untersuchungen extrahiert, portioniert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.

Die Meßwerte der ersten Untersuchung wurden gleich 100% gesetzt und dienten als Bezugswert für die späteren Messungen.

Bei allen fünf untersuchten Chargen konnte die Stabilität über den Zeitraum von 25 Wochen nachgewiesen werden. Allerdings mußten wir feststellen, daß



die Abweichungen der Meßwerte innerhalb der Chargen von einer Messung zur anderen bis zu 40% betragen können. Eine mögliche Ursache könnte eine unzureichende Homogenität der untersuchten Stuhlproben sein.

Mit der von uns aufgebauten Untersuchungsmethode zur Bestimmung der pankreatischen Elastase 1 in fäkalen Proben hatten wir uns ein Meßsystem geschaffen, mit dem es auf Grund der langen Verfügbarkeit möglich war, über einen längeren Zeitraum Patientenproben mit einer hohen Reproduzierbarkeit zu untersuchen.

## **2.12. Intra- und Interassay**

Der Intraassay wurde mit sieben an verschiedenen Tagen nach der Standardmethode hergestellten Testsystemen durchgeführt. Die in der Untersuchungsmethode enthaltenen fünf Standards sowie die Negativkontrolle und zwei Patientenproben wurden jeweils 12-mal aufgetragen. Die weitere Bearbeitung der Tests erfolgte nach der Standardanweisung. Von den jeweils 12 Meßwerten der Standards, der Negativkontrolle und der Proben wurden die Mittelwerte, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet. Aus diesen Werten wurden dann die mittlere Standardabweichung und der mittlere Variationskoeffizient der einzelnen Tests ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6 dargestellt.

Für den Interassay wurden fünf Chargen von jeweils 30 Tests nach der Standardvorschrift hergestellt. Nach dem Zufallsprinzip wurden jeder Charge 12 Tests entnommen. Den Platten der ausgewählten Tests entnahmen wir wiederum nach dem Zufallsprinzip einen Streifen, der dann chargenkonform in einen Plattenrahmen befestigt wurden. Das Auftragen der Standards, der Negativkontrollen und der zwei Patientenproben erfolgte nach dem gleichen Pipettierschema wie beim Interassay.

Tab. 6      Intraassay

Getestet wurden sieben mit dem Antikörper K 10 (Kaninchen) beschichtete Platten. Die sechs Standards des Testes und zwei extrahierte Stuhlproben wurden 12-mal aufgetragen. Von den

acht Proben wurde jeweils die Standardabweichung und der Variationskoeffizient errechnet. Die Mittelwerte ergaben die dargestellten Werte der einzelnen Platten.

Platten-Nr.	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	0,095	5,53
2	0,098	5,60
3	0,056	3,70
4	0,092	4,54
5	0,121	5,69
6	0,095	5,43
7	0,087	5,25

Tab. 7 Interassay

Getestet wurden jeweils 12 Strips von fünf mit dem Antikörper K 10 (Kaninchen) beschichteten Chargen. Die sechs Standards des Testes und zwei extrahierte Stuhlproben wurden 12-mal aufgetragen. Von den acht Proben wurde jeweils die Standardabweichung und der Variationskoeffizient errechnet. Die Mittelwerte ergaben die dargestellten Werte der einzelnen Chargen.

Chargen-Nr.	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	0,085	4,47
2	0,057	3,36
3	0,129	7,76
4	0,082	7,11
5	0,077	3,37

Die weitere Abarbeitung der Bestimmungen erfolgte wiederum nach der Standardanweisung. Von den mit einem ELISA-Reader gemessenen optischen Dichten wurden die Mittelwerte, die Standardabweichung und der

Variationskoeffizient der einzelnen Standards, Blindwerte und Proben errechnet. Aus diesen Werten wurden dann die mittlere Standardabweichung und der mittlere Variationskoeffizient der Charge ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6 dargestellt.

Sowohl die Variationskoeffizienten der Intraassay's von 3,70 bis 5,69 als auch der Interassay's von 3,36 bis 7,76 zeigten eine sehr hohe Reproduzierbarkeit und damit eine gute Präzision unserer Untersuchungsmethode. Die Qualität der einzelnen Tests und der produzierten Chargen entspricht den Anforderungen, die an einen Test gestellt werden, der für Routineuntersuchungen im medizinischen Labor eingesetzt wird.

### **2.13. Statistische Auswertungsmethoden**

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Parameter der deskriptiven Statistik mit Angabe von Mittelwert, Standardabweichung und mittleren Fehler des Mittelwertes.

Zum Vergleich von Mittelwerten wurde eine Varianzanalyse sich wiederholender Messungen und ein Vergleich der Meßgruppen mit der Bonferroni's Methode durchgeführt. Für die Berechnungen verwendeten wir das Statistikprogramm „Sigma Stat“ (Jandel Scientific). Der errechnete p-Wert gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Unterschied der Mittelwerte lediglich auf Zufall beruht.

Die Bewertung der analytische Zuverlässigkeit unserer Meßmethode erfolgte nach den Kriterien Präzision, Richtigkeit, analytischer Spezifität und Sensitivität.

Der diagnostische Wert unserer Methode wird durch die diagnostische Effizienz charakterisiert.

### **2.14. Einfluß von Substitutionsmitteln auf das Untersuchungsergebnis**

In der Therapie der oft mit einer Insuffizienz einhergehenden chronischen Pankreaserkrankungen werden zur Substitution der Patienten Präparate

eingesetzt, die aus dem Pankreas geschlachteter Schweine gewonnen werden und somit auch pankreatische Elastase enthalten. Da unverdaute Restmengen dieses Enzyms in Stuhlproben von substituierten Patienten enthalten sein können, war es wichtig, eine Kreuzreaktivität der Substitutionsmittel in unserer Untersuchungsmethode auszuschließen. Wir untersuchten fünf der am häufigsten in der Therapie einer Pankreasinsuffizienz eingesetzten Medikamente (Tabelle 8). Jeweils eine Kapsel der einzelnen Präparate wurde in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und dann unverdünnt sowie in Zweierverdünnungsstufen bis zu der Verdünnung 1:128 mit unserer Methode getestet. Die in den Untersuchungen gemessenen optischen Dichten wurden an Hand der mitgeführten Standards in  $\mu\text{g}$  Elastase 1/g Stuhl umgerechnet. Den in der Tabelle 8 aufgelisteten Ergebnissen ist zu entnehmen, daß die Medikamente Pankreatan, Panzytrat, Pangrol und Kreon sowohl unverdünnt als auch in den eingesetzten Verdünnungsstufen keine Kreuzreaktivität in unserer Untersuchungsmethode zeigten. Das Präparat Cotazym 30 000 reagierte, unverdünnt eingesetzt, ganz schwach mit den von uns verwendeten Antikörpern. Allerdings war die Reaktion wesentlich schwächer als bei der humanen Elastase 1, und die von uns untersuchte Konzentration war bedeutend höher als die bei hoch substituierten Patienten in fäkalen Proben mögliche. Die Verdünnungsstufen des Präparates zeigten keine Reaktion. Auf Grund der von uns durchgeführten Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, daß das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Bestimmungsverfahren bei substituierten Patienten als diagnostisches Verfahren eingesetzt werden kann.

Tab. 8            Substitutionsmittel

Getestet wurden fünf der am häufigsten in der Therapie von Patienten mit einer Pankreasinsuffizienz eingesetzten Präparate (Pankreatan 36 000, Cotazym 30 000, Panzytrat 40 000, Pangrol 25 000, Kreon 40 000). Die Substitutionsmittel wurden unverdünnt und in den Verdünnungen 1:2 bis 1: 128 (in zweier Verdünnungsschritten) eingesetzt. Die optischen Dichten der

Proben wurden an Hand der mitgeführten Standards in  $\mu\text{g}$  Elastase 1/g Stuhl umgerechnet.  
Die Bestimmungen wurden nach der Standardanweisung durchgeführt.

Verdünnung	Pankreatan 36 000	Cotazym 30 000	Panzytrat 40 000	Pangrol 25 000	Kreon 40 000
unverdünnt	9	16	12	13	13
1: 2	8	10	12	12	13
1: 4	9	8	12	10	14
1: 8	11	9	11	10	10
1: 16	9	7	10	10	12
1: 32	10	6	12	11	6
1: 64	11	6	13	12	10
1:128	14	6	13	13	11

### 3. Klinische Studien

#### 3.1. Patienten und Methodik

##### 3.1.1. Normalkollektiv

Von den 609 untersuchten Stuhlproben stammten 78 Proben von Blutspendern, die regelmäßig im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Greifswald Blut spenden.

Tab. 9 Normalkollektiv  
Einteilung der Probanden nach Geschlecht und Alter

Altersgruppe		Weiblich	männlich
20-30 Jahre	Anzahl	56	53
	Alter	$23,7 \pm 4,6$	$23,6 \pm 4,1$

31-40 Jahre	Anzahl	43	38
	Alter	$35,9 \pm 2,8$	$35,3 \pm 2,7$
41-50 Jahre	Anzahl	41	54
	Alter	$45,7 \pm 3,0$	$44,8 \pm 2,8$
51-60 Jahre	Anzahl	47	55
	Alter	$57,4 \pm 3,0$	$56,7 \pm 2,6$
61-70 Jahre	Anzahl	57	54
	Alter	$65,2 \pm 2,7$	$65,1 \pm 3,1$
71-80 Jahre	Anzahl	43	30
	Alter	$75,5 \pm 3,0$	$74,9 \pm 2,4$
81-90 Jahre	Anzahl	25	13
	Alter	$84,5 \pm 3,6$	$83,6 \pm 2,9$

Bei den anderen 531 Stuhlproben handelte es sich um fäkale Proben von Probanden, bei denen mit den üblichen klinischen diagnostischen Methoden eine Pankreasinsuffizienz ausgeschlossen werden konnte. In die Untersuchungen gingen 312 Stuhlproben von weiblichen und 297 Proben von männlichen Personen ein. Die Probanden wurden von uns nach dem Alter und dem Geschlecht in Gruppen eingeteilt (Tab. 9).

### 3.1.2. Patienten mit einer Mukoviszidose

Für die Untersuchungen dieser Patientengruppe standen uns 37 Stuhlproben von Jugendlichen mit Mukoviszidose und 56 Proben von gesunden Kindern zur Verfügung. Das Durchschnittsalter der Mukoviszidose-Patienten (21 Mädchen und 16 Jungen) lag bei 11 Jahren (7 bis 17). Die Kontrollgruppe umfaßte 21 Mädchen und 35 Jungen im Alter zwischen 5 und 16 Jahren. Die Kinder mit Mukoviszidose wurden alle zum Zeitpunkt der Probenentnahme mit Substitutionsmitteln von verschiedenen Herstellern behandelt.

### **3.1.3. Patienten mit einer sonographisch gesicherten chronischen Pankreatitis**

Dieser Gruppe wurden 98 Patienten zugeordnet, bei denen mit bildgebenden Verfahren eine chronische Pankreatitis diagnostiziert wurde. Untersucht wurden Stuhlproben von 34 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 50 Jahren (30 bis 82) und 64 Männern mit einem Durchschnittsalter von 51 Jahren

(28 bis 80). 24 männliche Patienten gaben einen täglichen Alkoholkonsum von mehr als 80g an. Bei 3 weiblichen Patienten lag die täglich konsumierte Alkoholmenge über 40 g. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen wurde bei 15 Männern und bei 8 Frauen eine Therapie mit Substitutionsmitteln durchgeführt.

Außer den 98 Stuhlproben von Patienten mit gesicherter Diagnose standen uns Stuhlproben von 26 Patienten mit einer noch nicht eindeutig diagnostizierten chronischen Pankreatitis zur Verfügung. Die Ergebnisse der Proben-analyse von den 15 Frauen (Durchschnittsalter 63 Jahre (47 bis 86) und den 11 Männern (Durchschnittsalter 52 Jahre (33 bis 73) sollen ebenfalls dargestellt werden. Bei sechs Männern lag der tägliche Alkoholkonsum über dem Wert von 80 g und bei zwei Frauen über 40 g.

Die Bestimmung der Elastase<sup>1</sup> in den fäkalen Proben erfolgte nach der Standardanweisung unserer Untersuchungsmethode.

### **3.1.4. Patienten mit einer akuten Pankreatitis**

Dieses Kollektiv umfaßte 18 Patienten mit einer diagnostizierten akuten Pankreatitis. Von den 13 Männern mit einem Durchschnittsalter von 52 Jahren (36 bis 78) wurde von vier der tägliche Alkoholkonsum mit mehr als 80 g angegeben. Von den fünf untersuchten Frauen mit einem Durchschnittsalter von 64 Jahren (51 bis 86) nahm eine mehr als 40 g Alkohol pro Tag zu sich. Bei vier Patienten bestand der Verdacht einer chronischen Pankreatitis. Zwei

Patienten waren neben der akuten Pankreatitis an einer Leberzirrhose erkrankt.

#### **3.1.5. Patienten mit einem Pankreaskarzinom**

Dieser Gruppe wurden 51 Patienten (27 Männer und 24 Frauen) zugeteilt. Das Durchschnittsalter bei den männlichen Patienten betrug 67 Jahre (40 bis 90) und das der Frauen 71 Jahre (49 bis 86). Die Diagnoseerstellung erfolgte mittels bildgebender Verfahren. Bei 8 Patienten wurde außer dem Pankreaskarzinom eine chronische Pankreatitis diagnostiziert. Ein Patient hatte außer dem Karzinom noch eine akute Pankreatitis. Von den 51 untersuchten Patienten wurde bei 15 eine mechanische Cholestase und bei 6 Patienten ein Gallensteinleiden festgestellt. Sechs Männer gaben ihren täglichen Alkoholkonsum mit mehr als 80 g an. 11 Patienten wurden zum Zeitpunkt der Probenentnahme mit Substitutionsmitteln behandelt.

#### **3.1.6. Patienten mit einer mechanischen Cholestase**

Für die Untersuchung dieser Erkrankung standen uns Stuhlproben von 118 Patienten zu Verfügung. Das Durchschnittsalter der 67 weiblichen Patienten betrug 69 Jahre (33 bis 91) und das der 51 männlichen Patienten 65 Jahre (26 bis 90).

Bei 7 Frauen und 8 Männern wurde außer der mechanischen Cholestase ein Pankreaskarzinom diagnostiziert. Diese Patienten wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Außerdem wurden sieben Patienten, die zusätzlich an einer chronischen Pankreatitis und drei Patienten, die an einer akuten Pankreatitis erkrankt waren, nicht in Betracht gezogen.



## **Patienten mit einer Choledocholithiasis**

Diese Gruppe umfaßte 65 Patienten (47 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 71 Jahren (33 bis 92) und 18 Männer mit einem Durchschnittsalter von 65 Jahren (26 bis 90). Bei zwei Frauen und Männern lag der Verdacht einer chronischen Pankreatitis vor. Zwei Patienten litten unter einer akuten Pankreatitis. Diese Patienten wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Von den 65 Patienten, die ein Gallensteinleiden hatten, wurde bei 37 Frauen und bei 14 Männern außerdem eine mechanische Cholestase diagnostiziert.

### **3.1.7. Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1**

Da bei Patienten mit einem Diabetes mellitus sehr häufig eine Beeinträchtigung der sekretorischen Leistung des exokrinen Pankreas auftreten kann, bezogen wir diese Patientengruppe in unsere Untersuchungen mit ein.

Für die Untersuchungen standen uns Stuhlproben von 55 Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1 zur Verfügung. Bei den 31 weiblichen Erkrankten lag das Durchschnittsalter bei 44 Jahren (21 bis 65) und die durchschnittliche Diabetesdauer bei 21 Jahren (1 bis 43). Die Gruppe der männlichen Patienten hatte ein Durchschnittsalter von 40 Jahren (20 bis 60) und eine durchschnittliche Diabetesdauer von 19 Jahren (2 bis 39).

Alle Patienten wurden seit der Diagnose des Diabetes mit Insulin behandelt. Die Proben wurden uns vom Herz- und Diabeteszentrum Mecklenburg-Vorpommern in Karlsburg zur Verfügung gestellt.

### **3.1.8. Untersuchungen von Stuhlproben eines unausgewählten Krankengutes**

Bei dieser Gruppe handelt es sich um 691 Patienten (346 Frauen und 345 Männer) der gastroenterologischen Sprechstunde der Klinik für Innere Medizin der Universität Leipzig. Die Patienten wurden mit undefinierten

Oberbauchbeschwerden in die Spezialklinik überwiesen. Das Durchschnittsalter der weiblichen Patienten betrug 61 Jahre (13 bis 98) und das der männlichen 60 Jahre (21 bis 88).

Alle Patienten wurden mit den in der Klinik etablierten bildgebenden Verfahren zur Diagnose einer chronischen Pankreatitis untersucht. Bei 63 Patienten wurde eine chronische Pankreatitis diagnostiziert, und bei 26 Patienten konnte eine chronische Pankreatitis nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

Die Stuhlproben der 691 Patienten wurden mit drei verschiedenen labordiagnostischen Testsystemen untersucht. Die Bestimmungen der Elastasewerte mit dem ELISA der ScheBo Tech GmbH und die der Chymotrypsinwerte mit dem Chymotrypsin Kinetik Test von Roche Diagnostics erfolgten durch Mitarbeiter des Labors der Medizinischen Klinik Leipzig. Die Bearbeitung der Stuhlproben mit unserer Bestimmungsmethode wurde im Labor der Bioserv AG durchgeführt. Die Testdurchführung erfolgte nach der jeweils für den Test vorgeschriebenen Testanweisung.

### **3.2. Ergebnisse der klinischen Studien**

Das Ziel der hier vorgelegten Arbeit bestand darin, eine bisher nicht beschriebene Bestimmungsmethode der humanen fäkalen Elastase 1 auf der Basis polyklonaler Antikörper zu entwickeln und diese an Probengut von Probanden ohne eingeschränkte Pankreasfunktion (Normalkollektiv) und von Patienten mit chronischen Pankreaserkrankungen zu validieren. Die Bewertung der Stuhlproben erfolgte nach dem in dieser Arbeit definierten Referenzbereich, d.h. Proben  $< 100 \mu\text{g}$  Elastase 1/g Stuhl zeigten eine schwere Pankreasinsuffizienz, Proben mit einer Elastase 1-Konzentration von 100 bis  $200 \mu\text{g/g}$  Stuhl eine eingeschränkte Pankreasfunktion und Elastase 1-Werte  $> 200 \mu\text{g/g}$  Stuhl den Normalbereich an.

**Normalkollektiv** Für die 609 Probanden dieses Kollektivs wurde ein Mittelwert der Elastase 1-Konzentration in den fäkalen Proben von  $430 \mu\text{g/g}$  Stuhl (SEM 9,12%) ermittelt. Der Mittelwert der weiblichen Personen lag mit

451  $\mu\text{g}$  Elastase 1/g Stuhl (SEM 12,30%) um 10% höher als bei den männlichen (MW 407, SEM 13,34). Vom gesamten Probenmaterial lagen 5% der Elastasewerte im pathologischen Bereich. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da dieser Anteil dem unteren 2s-Bereich einer Gaußverteilung entspricht.

In der Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Elastase 1-Bestimmungen der fäkalen Proben der Probanden, bei denen eine Pankreasinsuffizienz ausgeschlossen werden konnte, nach Geschlecht und Alter getrennt dargestellt. Die Elastase 1-Konzentrationen bei den weiblichen Probanden der Altersgruppe der 20- bis 30-jährigen war signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als bei den anderen Altersgruppen der Frauen. Für den Unterschied zwischen der Altersgruppe der 20- bis 30-jährigen Männer zu den anderen Gruppen der männlichen Probanden gab es keine Signifikanz.

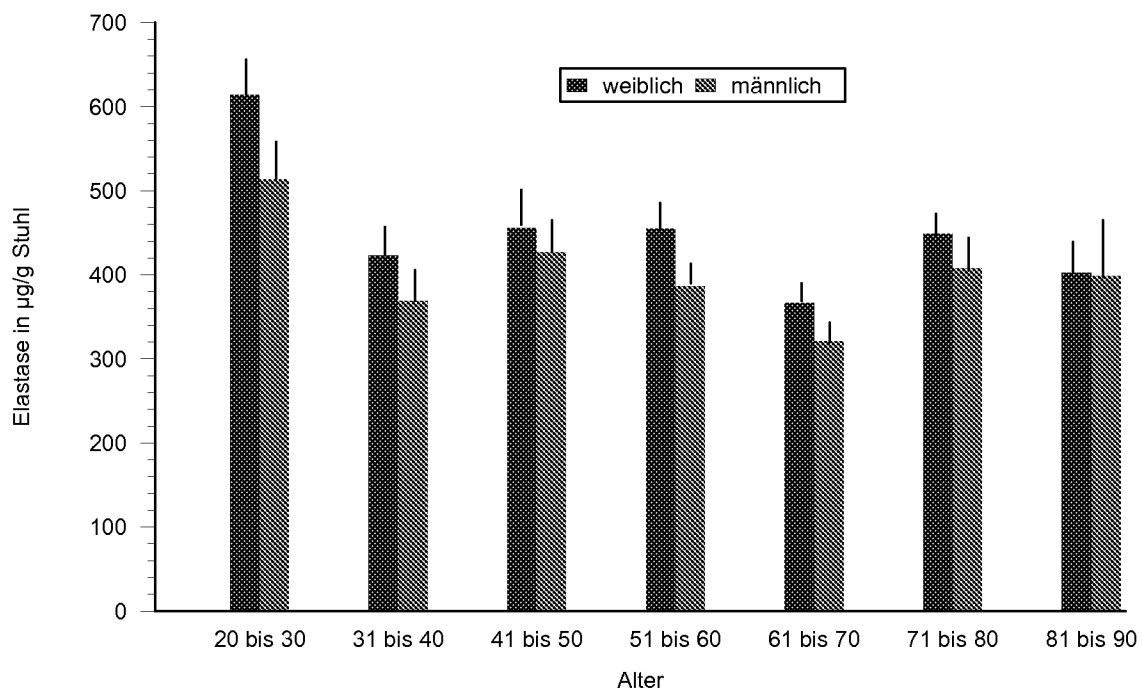


Abb. 14 Normalkollektiv

Bestimmt wurde die Elastase 1-Konzentration in 609 Stuhlproben von Probanden bei denen eine Pankreasinsuffizienz

ausgeschlossen wurde. Die Werte wurden nach Geschlecht und Alter der Probanden dargestellt. Pro Gruppe wurden 29 bis 56 Personen untersucht.

Die Elastase 1-Bestimmung erfolgte nach der Standardmethode.

**Mukoviszidose** Bei 80 bis 90% der an Mukoviszidose erkrankten Kinder tritt im Verlauf der Erkrankung eine Pankreasinsuffizienz auf (Abrams et al. 1984, van Hubbard et al. 1987, Herzig et al. 1996, Carrere et al. 1998).

In den mit unserer Bestimmungsmethode untersuchten Stuhlproben von Patienten mit manifestierter und eindeutig diagnostizierter Mukoviszidose wiesen alle gemessenen Elastase 1-Konzentrationen auf eine schwere Pankreasinsuffizienz hin (Abb. 15). In den 37 fäkalen Proben lagen die Elastase 1- Werte immer unter 50  $\mu\text{g/g}$  Stuhl, der Anteil der Proben unter 10  $\mu\text{g}$  Elastase 1/g Stuhl betrug 72% (26 Patienten).

Die ebenfalls in dieser Studie bestimmten fäkalen Elastase 1-Konzentrationen der Kontrollgruppe (Stuhlproben von 56 gesunden Kindern) wiesen alle Proben bis auf zwei Ausnahmen Elastase 1-Werte über 200  $\mu\text{g}$  /g Stuhl (Mittelwert 587  $\mu\text{g}$  Elastase 1/g Stuhl) auf. Bei 27 Kindern (68%) lagen die im Stuhl bestimmten Elastase 1-Konzentrationen über 500  $\mu\text{g}$  Elastase 1/g Stuhl (Mittelwert 721  $\mu\text{g}$  Elastase 1/g Stuhl).



Abb. 15 Vergleich der Elastase 1-Konzentrationen in fäkalen Proben von Patienten mit einer Mukoviszidose und einer Kontrollgruppe

In die Untersuchungen gingen Stuhlproben von 37 Patienten mit Mukoviszidose und 56 von gesunden Kindern ein. Die Elastase 1-Konzentrationen wurden logarithmisch dargestellt

**Chronische Pankreatitis** Die chronische Pankreatitis ist eine der Hauptursachen für die Ausbildung einer exokrinen Pankreasinsuffizienz. In unseren Untersuchungen konnten wir durch die Bestimmung der fäkalen Elastase 1 bei 45 Patienten (46%) eine schwere Pankreasinsuffizienz und bei 18 (18%) eine eingeschränkte Pankreasfunktion nachweisen (Abb. 16).

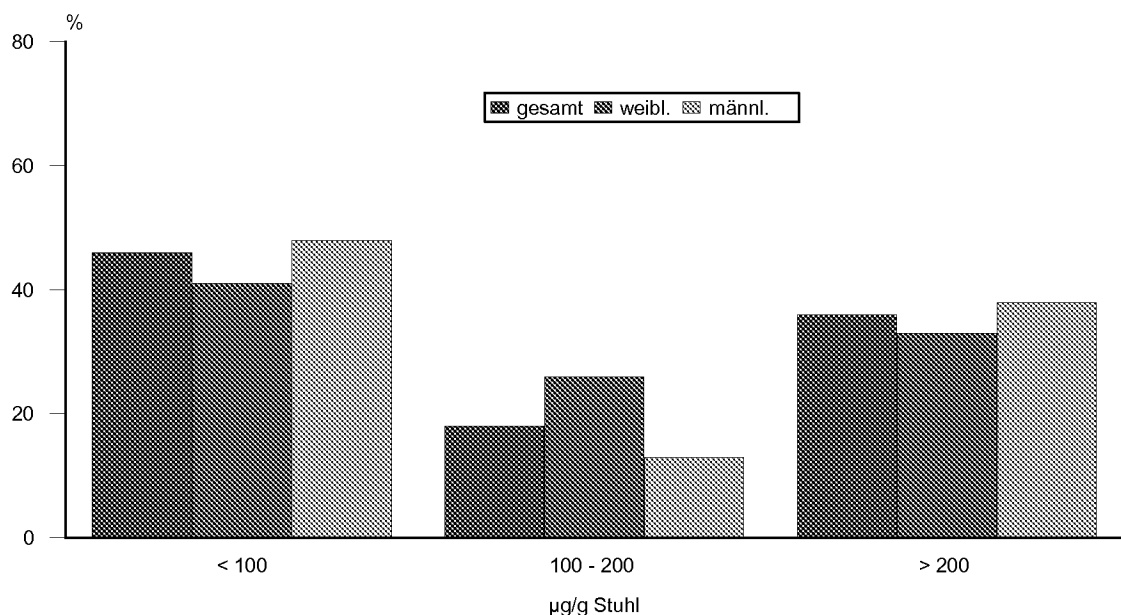


Abb. 16 Prozentuale Verteilung der Patienten mit einer sonographisch gesicherten chronischen Pankreatitis (n = 98)

Bei 37 Patienten lagen die Werte über dem Referenzwert von 200 µg Elastase 1/g Stuhl, so daß wahrscheinlich davon auszugehen war, daß bei diesen Pankreatitiden noch keine Insuffizienz des exokrinen Pankreas vorlag.

Auffallend ist, daß der Anteil der weiblichen Patienten mit einer ausgeprägten Pankreasinsuffizienz (Elastase 1  $> 100 \mu\text{g/g}$  Stuhl) um 7 % niedriger war als bei der männlichen Patientengruppe. Dem gegenüber hatten zweimal so viele Frauen (12 Patienten) eine eingeschränkte Pankreasfunktion (Elastase 1 100 bis  $200 \mu\text{g/g}$  Stuhl) als die Männer (6 Patienten).

Die gleiche Beobachtung machten wir bei Patienten, bei denen auf Grund der Anamnese und der körperlichen Untersuchung der Verdacht einer chronischen Pankreatitis bestand, diese aber durch sonographische Untersuchungsmethoden nicht eindeutig diagnostiziert werden konnte. Wie in der Abbildung 17 dargestellt, lag der Anteil der weiblichen Patienten mit einer ausgeprägten Pankreasinsuffizienz bei 20% (Männer 28%) und mit einer eingeschränkten Pankreasfunktion bei 33% (Männer 18%).

13 Patienten (50%) mit dem Verdacht einer chronischen Pankreatitis hatten Elastase 1-Konzentrationen unter  $200 \mu\text{g/g}$  Stuhl.

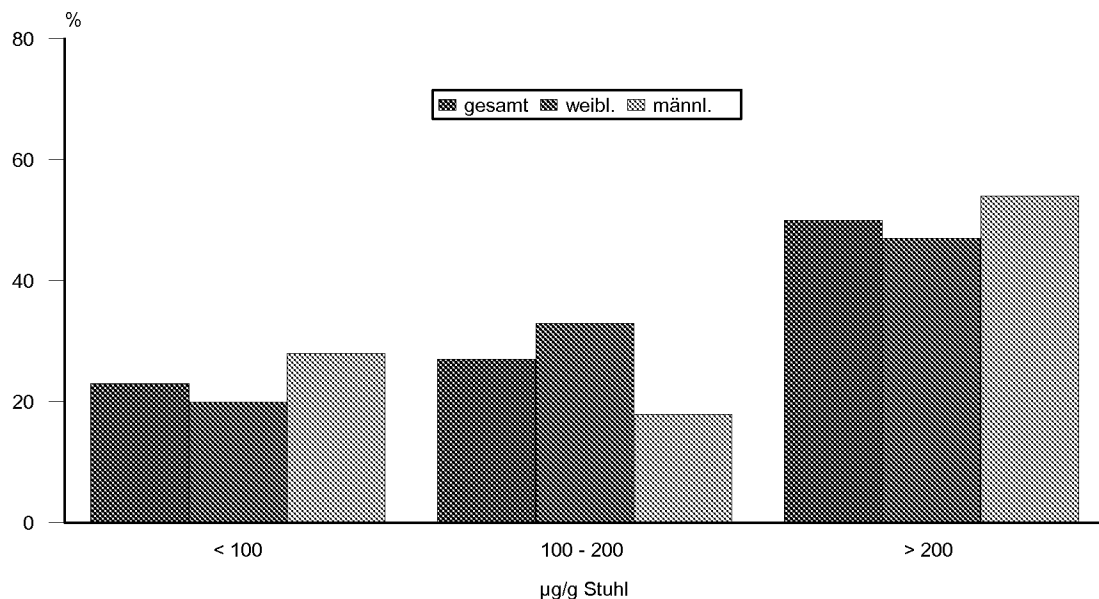


Abb. 17 Prozentuale Verteilung der Patienten mit Verdacht auf eine chronische Pankreatitis (n = 26)

**Akute Pankreatitis** Die Bestimmung der pankreatischen Elastase 1 in Stuhlproben von Patienten mit einer diagnostizierten akuten Pankreatitis ergab, wie der Abbildung 18 zu entnehmen ist, keine Werte, die auf eine ausgeprägte exokrine Pankreasinsuffizienz hinwiesen. Von den 18 uns zur Verfügung stehenden Proben wurden in 6 (33%) Elastase 1-Werte gemessen, die auf eine eingeschränkte Pankreasfunktion schließen lassen. Der Anteil der männlichen Patienten dieser Gruppe betrug 83%.

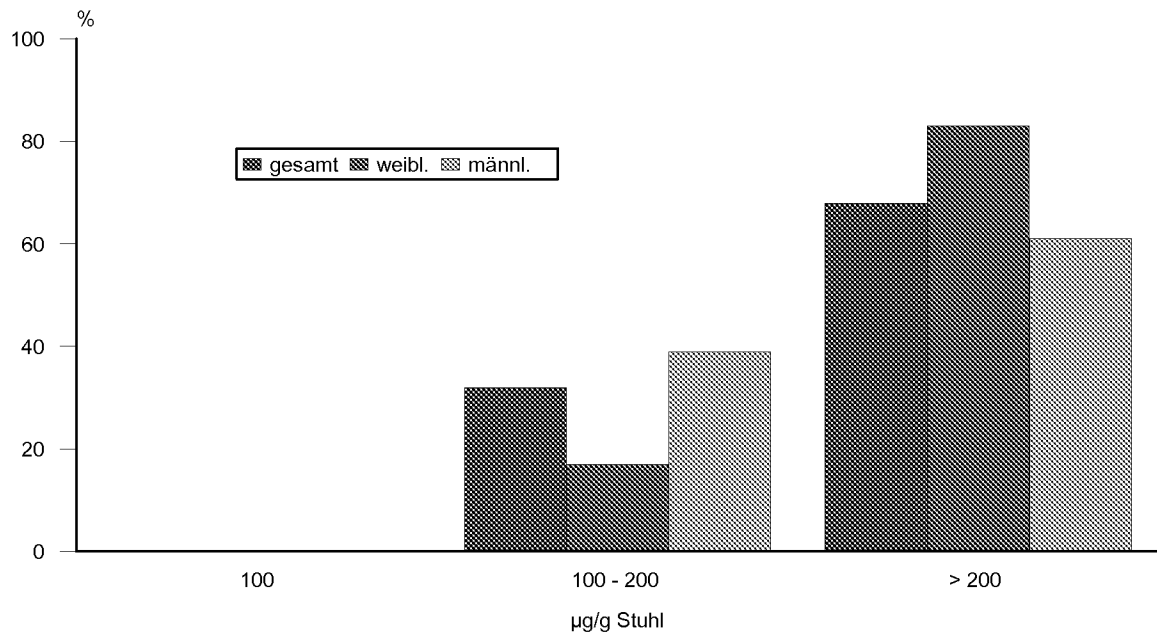


Abb. 18 Prozentuale Verteilung der Patienten mit einer akuten Pankreatitis (n = 18)

**Pankreaskarzinom** Neben der chronischen Pankreatitis ist das Pankreaskopfkarzinom die Hauptursache für das Auftreten einer exokrinen Pankreasinsuffizienz. In den mit unserer Methode untersuchten Stuhlproben der Patienten mit einem Pankreaskopfkarzinom zeigten 31 (61%) eine gestörte

sekretorische Leistung des exokrinen Pankreas an. Bei 20 Patienten (39%) weisen die Elastase 1-Werte auf eine schwere Pankreasinsuffizienz hin, und 11 Erkrankte (22%) haben wahrscheinlich eine eingeschränkte Pankreasfunktion. In den fäkalen Proben von 20 Patienten lagen die Elastasekonzentrationen über 200 µg/g Stuhl. Das deutet darauf hin, daß bei dieser Gruppe keine Pankreasinsuffizienz vorliegt (Abb. 19).

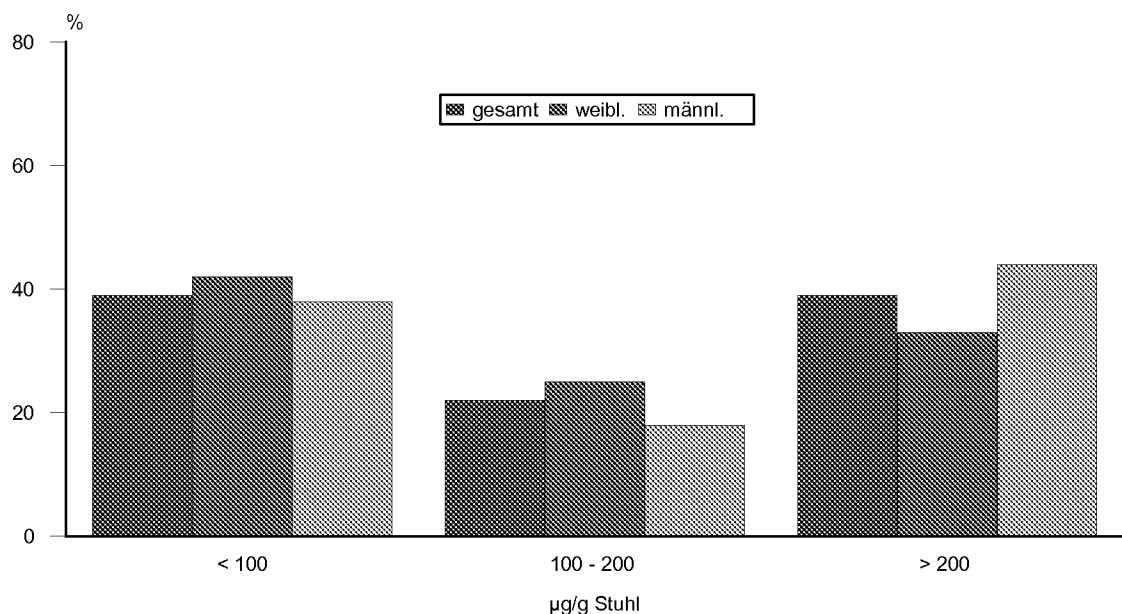


Abb. 19 Prozentuale Verteilung der Patienten mit einem Pankreaskarzinom (n = 51)

**Choledocholithiasis** Die Elastase 1-Bestimmungen der Stuhlproben von Patienten mit einer Choledocholithiasis bzw. mechanischen Cholestase ergaben bei 71% (41 Patienten) bzw. 73% (65 Patienten) der untersuchten Proben eine Elastase 1-Konzentration über dem Referenzwert unserer Methode



(>200 µg Elastase 1/g Stuhl). In fünf Stuhlproben der Choledocholithiasis-Patienten (8%) wurden Elastase 1-Werte gemessen, die auf eine ausgeprägte Pankreasinsuffizienz hinweisen, und bei 12 Proben (21%) kann auf Grund der Werte mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer eingeschränkten Pankreasfunktion ausgegangen werden (Abb.20).

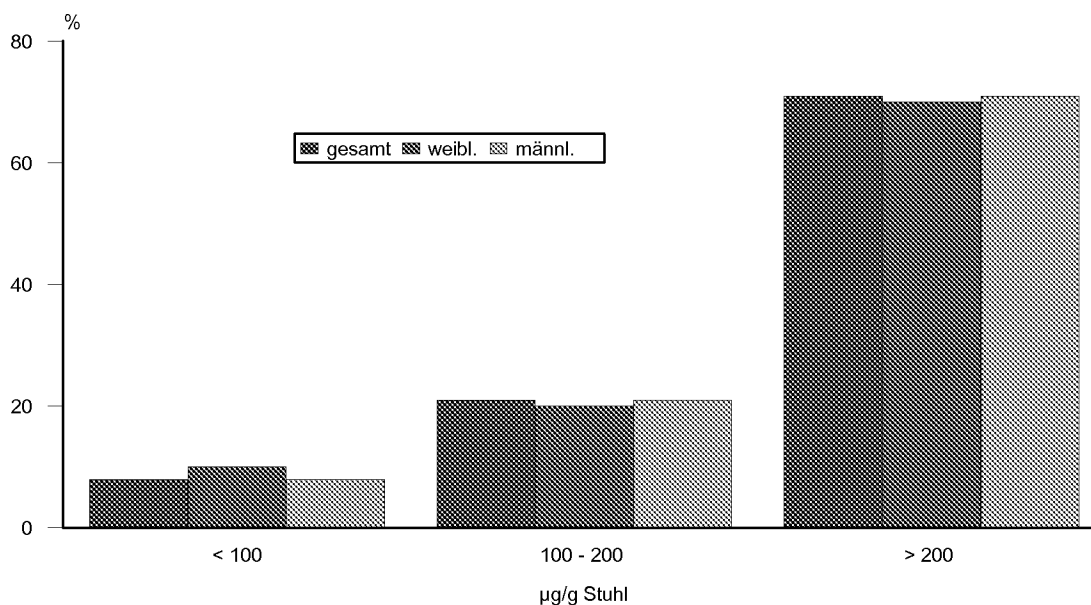


Abb. 20 Prozentuale Anteil der Patienten mit einer Choledocholithiasis (n = 58)

**Mechanische Cholestase** Bei den Patienten mit einer mechanischen Cholestase weisen die gemessenen fäkalen Elastase 1-Konzentrationen bei 8 Probanden (9%) auf eine schwere und bei 16 (18%) auf eine leichte Pankreasinsuffizienz hin. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Abbildung 21 dargestellt.

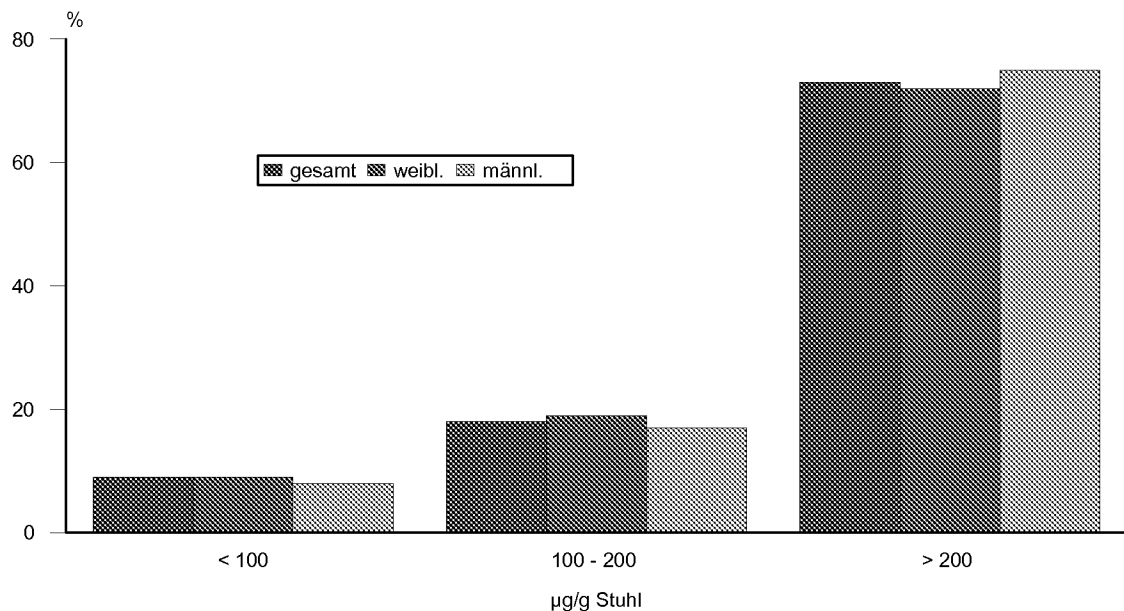


Abb. 21 Prozentuale Verteilung der Patienten mit einer mechanischen Cholestase (n = 58)

**Diabetes mellitus** Die Ausprägung einer exokrinen Pankreasinsuffizienz verursacht durch den Diabetes mellitus wird zur Zeit in vielen Publikationen sehr kontrovers diskutiert ( Gröger et al. 1995, Bräuning 1998, Lankisch und Nauck 2000). Mit unserer Methode zur Bestimmung der fäkalen Elastase1 wurden Stuhlproben von 55 Diabetikern Typ 1 untersucht. In der Abbildung 22 wurde der prozentuale Anteil der Patienten mit Elastase 1-Werten unter 200 µg/g Stuhl (Referenzwert unserer Methode) nach Dauer des Diabetes dargestellt. Leider war die Anzahl der uns zur Verfügung stehenden Proben zu gering, um die Ergebnisse noch aussagekräftiger zu erhalten. Wir konnten in ersten Untersuchungen zeigen, daß mit zunehmender Diabetesdauer der prozentuale Anteil der Patienten mit einer eingeschränkten Pankreasfunktion zunimmt.

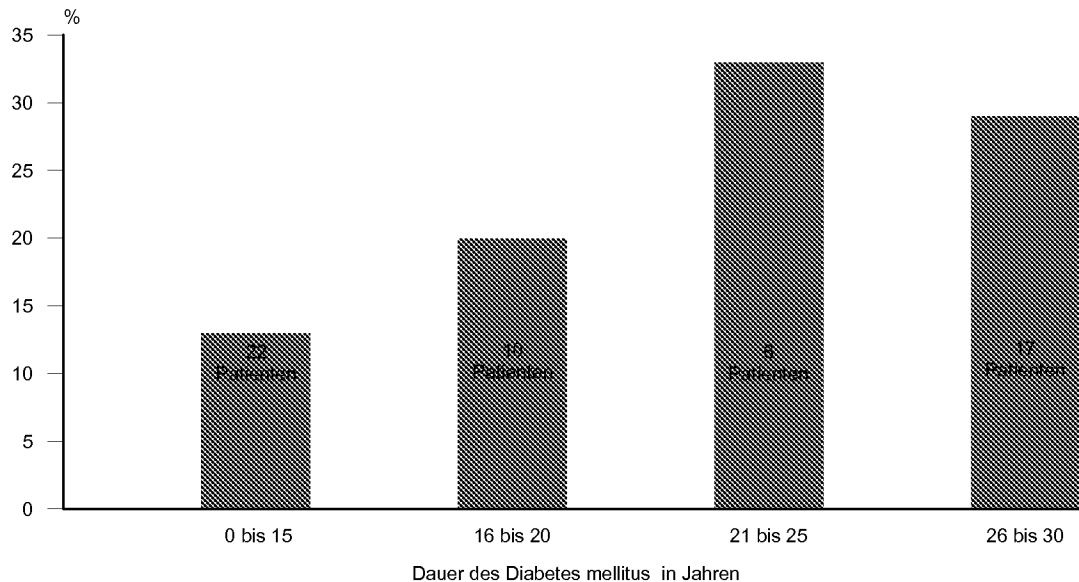


Abb. 22 Anteil der Patienten mit eingeschränkter exokriner Pankreasfunktion bei insulinabhängigem Diabetes mellitus.

Die Vergleichsuntersuchungen zweier kommerziell erhältlicher indirekter Testsysteme für die Diagnose einer exokrinen Pankreasinsuffizienz mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Bestimmungsmethode wurden an 699 Stuhlproben durchgeführt. Die Spezifität bzw. Sensitivität unserer Methode war um 12 bzw. 2% höher als die des kommerziell verfügbaren Elastase 1-Testes und um 20% bzw. 6% höher als beim Chymotrypsin Kinetik Test. Die daraus resultierende Präzision betrug bei unserer Elastase 1-Bestimmungsmethode 72%, bei dem käuflich verfügbaren Elastase 1-ELISA 62% und dem Enzym Kinetik Test 54%. Die Ergebnisse wurden in der Abbildung 23 graphisch dargestellt.

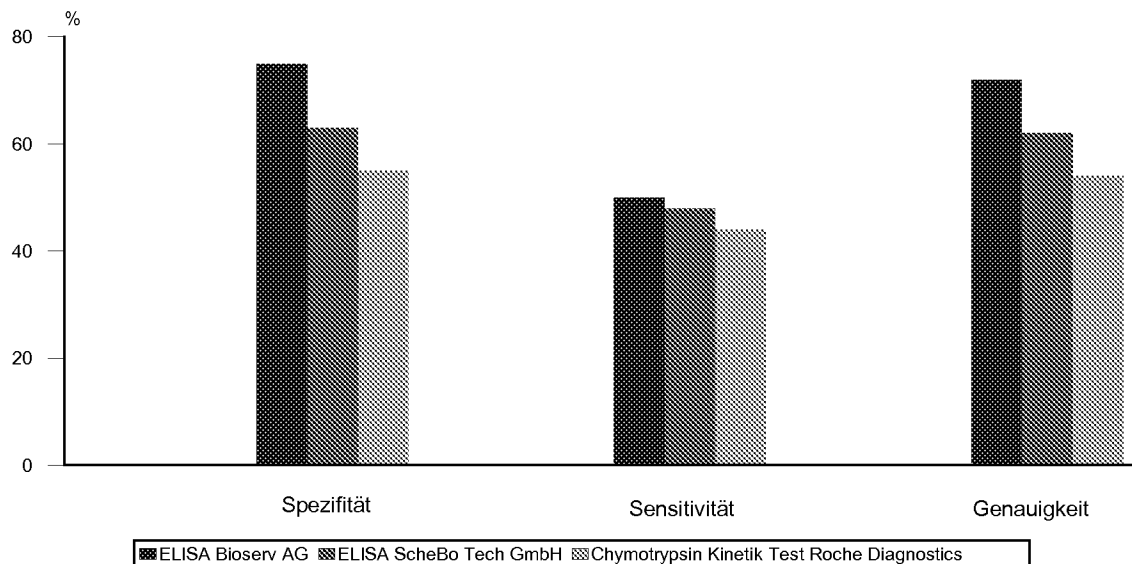


Abb. 23 Vergleich von drei Testsystemen zur Diagnose einer chronischen Pankreatitis

Die Untersuchungen wurden an 699 Stuhlproben von Patienten der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Leipzig durchgeführt. Bei 64 Patienten wurde durch bildgebende Verfahren eine chronische Pankreatitis diagnostiziert. Die Abarbeitung der fäkalen Proben erfolgte als Doppelbestimmung nach den jeweiligen Testanweisungen.

Der Zusammenstellung der Patientenkollektive in der Tabelle 10 ist zu entnehmen, daß bei Patienten mit einer manifestierten Mukoviszidose in allen Fällen die Erkrankung mit einer Pankreasinsuffizienz einherging. Von den chronischen Pankreatitiden wurde bei 62 Patienten (64%) und den Patienten mit einem Pankreaskarzinom bei 31 (61%) eine mögliche eingeschränkte Pankreasfunktion mit unserer Untersuchungsmethode diagnostiziert.

Bei der akuten Pankreatitis lagen 33% (6 Patienten), bei der Choledocholithiasis 29% (17 Patienten) und bei der mechanischen Cholestase

27% (24 Patienten) der in den fäkalen Proben bestimmten Elastase 1-Konzentrationen unter dem Referenzwert (200 µg/g Stuhl).

Tab. 10 Patienten mit verschiedenen klinischen Diagnosen untersucht auf Pankreasinsuffizienz mittels Elastase1-Bestimmung im Stuhl

Elastase 1 > 200 µg/g Stuhl	Normbereich
Elastase 1 100 bis 200 µg/g Stuhl	leichte Pankreasinsuffizienz
Elastase 1 < 100 µg/g Stuhl	schwere Pankreasinsuffizienz

Klinische Diagnose	n	Laborchemisch bestimmte Elastasewerte			Pankreasinsuffizienz bei
		> 200	100 bis 200	< 100	
Mukoviszidose	36	0	0	36 (1±12)	100%
Chron. Pankreatitis	98	36 (428±27)	18 (137±6)	44 (38±5)	63%
Verd. chr. Pankreatitis	26	13 (485±45)	7 (142±12)	6 (48±12)	50%
Akute Pankreatitis	18	12 (414±42)	6 (136±15)	0	33%
Pankreaskarzinom	51	20 (441±41)	11 (149±9)	20 (30±7)	61%
Choledocholithiasis	58	41 (542±31)	12 (155±8)	5 (36±11)	29%
Mech. Cholestase	89	65 (483±22)	16 (160±6)	8 (43±13)	27%
Diabetes mellitus	55	41 (352±20)	11 (136±6)	3 (57±18)	44%

#### 4. Diskussion

Eine gestörte intraluminale Nährstoffverdauung ist in den meisten Fällen die Folge einer exokrinen Pankreasinsuffizienz, die durch eine verminderte Syntheseleistung der enzymproduzierenden Zellen, eine Verminderung der enzymsynthetisierenden (sezernierenden) Zellen oder eine Störung des Abflusses der Enzyme aus dem exokrinen Pankreas verursacht werden kann. Eine exokrine Pankreasinsuffizienz ist gemeinsames Hauptsymptom zahlreicher, meist chronischer Pankreaserkrankungen. Die Hauptursachen

sind jedoch die chronische Pankreatitis und das Pankreaskarzinom. Bei Patienten, die an der Mukoviszidose erkrankt sind, führt der gestörte transepitheliale Transport von Natrium- und Chloridionen zur Verlegung der Pankreasausführungsgänge mit zähem Schleim. Diese Dysfunktion kann ebenfalls zu einer Pankreasinsuffizienz führen. Eine weitere Ursache für eine eingeschränkte Funktion des exokrinen Pankreas und möglicherweise einer exokrinen Pankreasinsuffizienz kann bei Diabetikern die enge anatomische Nachbarschaft mit dem endokrinen Anteil sein, da der durch den Diabetes mellitus geschädigte endokrine Anteil der Drüse den exokrinen negativ beeinflussen kann (Lankisch und Nauck 2000).

Bei Patienten mit unklaren Oberbauchbeschwerden und/oder unklaren Durchfällen muß nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden, ob das Pankreas die Ursache der Erkrankungen ist. Bei der Abklärung wird oft auf morphologische Untersuchungsmethoden, wie Sonographie, Computertomographie, endoskopischer Ultraschall, Magnetresonanztomographie und endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie zurückgegriffen. Keinesfalls sollte aufgrund des Ergebnisses eines einzigen bildgebenden Verfahrens die Diagnose einer Erkrankung des exokrinen Pankreas gestellt oder ausgeschlossen werden, da z.B. ein unauffälliger Ultraschall- oder Computertomographie-Befund eine Pankreaserkrankung keinesfalls ausschließt (Lankisch und Schmidt 1999). Neben der relativ geringen Spezifität und Sensitivität der bildgebenden Verfahren, insbesondere in den Frühstadien der Erkrankung, sind diese Methoden oft verbunden mit großen finanziellen Aufwendungen bei der Anschaffung und bei der Unterhaltung der technischen Ausrüstungen und erfordern vom diagnostizierenden Arzt ein hohes Maß an Erfahrung. Das sicherste Verfahren in der Pankreasdiagnostik mit einer hohen Spezifität und Sensitivität ist der Sekretin-Pankreozymin-Test (Lankisch et al. 1993, Löser et al. 1997). Dieses Testsystem korreliert am besten mit den histologischen Untersuchungen von intraoperativ gewonnenem Pankreasgewebe (Lankisch und Schmidt 1999). Für den routinemäßigen Einsatz ist das Testverfahren

allerdings zu teuer und zu aufwendig. Darüber hinaus wird der Patient durch diese Untersuchungsmethode stark belastet. Der Sekretin-Pankreozymin-Test kommt deshalb nur bei gezielter Indikation in Spezialkliniken zur Anwendung. Neben den direkten Verfahren werden eine Reihe von indirekten Testsystemen bei der Diagnose einer exokrinen Pankreasinsuffizienz eingesetzt, bei denen aus dem Nachweis einer Maldigestion auf eine verminderte Pankreassekretion geschlossen werden kann. Diese Verfahren sind für den Patienten weniger belastend, da Körperausscheidungen wie Stuhl oder Urin für die Untersuchungen eingesetzt werden. Der technische Aufwand dieser Methoden ist geringer. Die am häufigsten eingesetzten Verfahren sind der NBT-PABA-Test, die quantitative Fettstuhlbestimmung und die Bestimmung der Stuhlchymotrypsinaktivität. Alle drei Testsysteme haben den Nachteil, daß Enzymaktivitäten und somit nur intakte Enzyme nachgewiesen werden können. Die vom exokrinen Pankreas sezernierten Verdauungsenzyme verlieren während der Darmpassage infolge der stattfindenden Proteolyse im unterschiedlichen Maße ihre enzymatische Aktivität (Stein et al. 1996, Doppl et al. 1994), so daß bei diesen Testverfahren große Varianzen in der Reproduzierbarkeit und Präzision auftreten können. Eines der ersten Testsysteme, in dem nicht die Enzymaktivität sondern die Proteinmenge des Enzyms mittels monoklonaler Antikörper bestimmt wird, wurde 1990 entwickelt (Scheefers-Borchel et al. 1992). In dem ELISA wird die pankreatische Elastase im Stuhl als Marker für die Diagnose einer Pankreasinsuffizienz genutzt. Die pankreatische Elastase zeichnet sich gegenüber den anderen vom exokrinen Pankreas sezernierten Enzymen durch eine erstaunlich hohe Stabilität während der Darmpassage aus, so daß die Konzentration der Elastase im Stuhl die exokrine Pankreasfunktion sehr gut widerspiegelt. In den von uns durchgeführten Wiederfindungsuntersuchungen (Abb. 9) konnten wir nachweisen, daß die Elastasekonzentration in extrahierten Stuhlproben über 14 Tage sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37°C stabil bleibt. Zu einem drastischen Abfall der Werte kommt es erst nach 21 Tagen, der auch durch

den Zusatz von Natriumazid unter der Prämisse der Hemmung enteraler bakterieller Proteasen zu keiner Verbesserung der Wiederfindungsrate führte. Mit unseren Untersuchungen konnten die Ergebnisse von Krause (1989), der nach der Stuhlprobenlagerung über 14 Tage bei 4°C einen Abfall der Elastasekonzentration von weniger als 10% beobachtete, bestätigt werden.

Trotz der hohen Stabilität der Elastase in Fäkalproben ist davon auszugehen, daß das Molekül während der Passage durch das Duodenum proteolytischen Abbauprozessen unterliegt, so daß ein bestimmter Anteil der Elastase wahrscheinlich als gespaltenes Molekül im Stuhl enthalten ist. Um auch die Elastasebruchstücke weitgehend in der Untersuchungsmethode erfassen zu können, verwendeten wir polyklonale peptid-spezifische Antikörper, die in der Lage sind, mehrere Epitope der Elastase zu erkennen. Durch das Miteinbeziehen der gespaltenen Elastasemoleküle in unsere Messungen erzielten wir die erhoffte Erhöhung der Sensitivität dieser Untersuchungsmethode.

Da die humane pankreatische Elastase eine relativ hohe Homologie mit der Aminosäuresequenz der in der Substitutionstherapie eingesetzten porcinen Elastase aufweist, war es wichtig zu klären, daß die von uns eingesetzten Antikörper keine Kreuzreaktivität zu den Substitutionsmitteln aufweisen. Zu diesem Zweck wurden fünf Handelspräparate, die u.a. lyophilisierte Schweinepankreasauszüge enthalten, in unserer Bestimmungsmethode untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, daß ein Präparat, in hoher Konzentration eingesetzt, Bestandteile enthielt, die mit den Elastase 1-spezifischen Antikörpern reagierten. Allerdings entspricht die eingesetzte Substratmenge nicht den bei der Substitutionstherapie eingesetzten Dosierungen. Die anderen untersuchten Präparate zeigten keine Kreuzreaktivität mit den in unserer Untersuchungsmethode eingesetzten Antikörpern. Aus diesem Grund kann eine Substitutionstherapie weitergeführt werden, wenn eine Elastasebestimmung zur Beurteilung der exokrinen Pankreasfunktion durchgeführt werden soll. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber anderen indirekten Testverfahren.



Eine sehr wichtige Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit und die Präzision unserer Untersuchungsmethode ist die Extraktion der Elastase aus den Stuhlproben. Um die während der Darmpassage an Cholesterin und Salzen gebundene Elastase für die Antikörperbindung als freies Molekül zur Verfügung zu haben, setzten wir unserem Extraktionspuffer die Tenside Tween 20 und Triton x-100 in verschiedenen Konzentrationen zu. Wie der Abbildung 6 zu entnehmen ist, führte der Zusatz von Tween 20 bzw. Triton x-100 zur Erhöhung der extrahierten Elastasemenge. Tenside spalten wahrscheinlich die Liganden von der Elastase ab, so daß Antikörperbindungsstellen des Moleküls entblößt werden, und damit mehr Elastase in unserem Untersuchungssystem gebunden und damit nachgewiesen werden kann.

Weiterhin zeigen unsere Untersuchungen, daß die richtige Wahl der Extraktionstemperatur und der Extraktionszeit bei der Extraktion von großer Bedeutung ist. Die höchste Proteinmenge der Elastase konnte nach einer 15-minütigen Extraktionsdauer bei Raumtemperatur bestimmt werden. Schon eine Verlängerung der Extraktionszeit auf 2 h bedeutete einen Abfall der Elastasewerte auf 64%, und nach 12 h fiel der Wert auf 42%. Die Extraktion der Stuhlproben über 12 h bei 4°C verminderte ebenfalls die Elastasekonzentration im Vergleich zur optimierten Methode. Extraktionen über 12 h bei 22°C bzw. bei 37°C verminderten die Konzentrationen der Elastase auf 42 bzw. 75% gegenüber der Vergleichsextraktionsmethode. Sowohl die zeitliche als auch die Temperaturabhängigkeit der extrahierten Elastasemenge sind wahrscheinlich auf die in den Stuhlproben vorhandenen Proteasen, die das Elastasemolekül enzymatisch abbauen, zurückzuführen. Das intensive Homogenisieren der Stuhlproben mit anschließender 15-minütiger Extraktion, nochmaligem intensiven Homogenisieren und dem sofortigen Trennen des Überstandes vom Stuhlsediment sind nach den vorliegenden Ergebnissen essentielle Voraussetzungen, um die Elastase quantitativ aus den Proben extrahieren zu können. Das Einhalten des exakten Zeitregimes ist ein wichtiges Kriterium, um reproduzierbare Ergebnisse bei der

Probenaufbereitung zu erzielen, denn bei gleicher Temperatur können die extrahierten Elastasemengen innerhalb von Stunden stark variieren (Abb. 8). Um bei den Versuchen zur Validierung der Untersuchungsmethode an Patientenproben immer die gleichen Testbedingungen garantieren zu können, strebten wir eine Verwendungsdauer der einzelnen Bestandteile unserer Untersuchungsmethode von einem halben Jahr an. Das Streptavidin-POD-Konjugat konnten wir durch den Zusatz von tierischen Seren und die Zugabe von 2-((Ethylmercurio)thio)-bezoessäure Natriumsalz über 21 Wochen stabil halten. Die Zugabe von tierischem Serumalbumin in die biologischen Standards und in das Anti-Elastase-Biotin-Konjugat erwies sich als Störfaktor für unsere Untersuchungsmethode. Es kam zu keiner nachweisbaren Antigen-Antikörperbindung. Möglicherweise verändern die in den Seren enthaltenen  $\alpha$ -Makroglobuline die Struktur der Proteasen und damit auch der Elastase (Moise 1996), so daß das Molekül als Antigen für eine mögliche Antikörperbindung nicht zur Verfügung steht. Erst der Einsatz von Immunglobulinen, die wir aus Hühnereiern präparierten (IgY), führte dazu, daß die Biotin-Konjugate über einen Zeitraum von 27 Wochen stabil waren (Abb. 10). Soweit uns bekannt ist, gibt es keine Literaturangaben über die Wirkung von IgY-Präparaten auf die Antigeneigenschaften der humanen Elastase. Eine mögliche Erklärung für die proteinstabilisierende Wirkung der Immunglobuline des Huhnes könnte darin liegen, daß die  $\alpha$ -Makroglobuline des Huhnes auf Grund der Phylogenese die humanen pankreatischen Proteasen nicht binden können, oder aber im Dotter des Hühnereies sind keine  $\alpha$ -Makroglobuline vorhanden. Auf jeden Fall stellt die Stabilisierung von Antikörperkonjugaten mit Immunglobulinen des Huhnes eine brauchbare Alternative zu herkömmlichen Methoden dar.

Um auch bei den biologischen Standards eine hohe Stabilität zu erreichen, versuchten wir durch Zugabe von verschiedenen Zuckern die native Proteinstruktur zu erhalten. Zucker bewirken auf Grund ihrer hydrophilen Eigenschaften eine Veränderung der Struktur des im Puffer enthaltenen Wassers, so daß Proteinstrukturen besser erhalten bleiben. Die in der Tab. 5

aufgelisteten Ergebnisse zeigen zwar recht deutlich, daß die Zugabe von Lactose bzw. Saccharose in den Standardpuffer (phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung) den Abbau der Elastase stark herabsetzt, aber der Abfall der Werte um mindestens 20% konnte nicht verhindert werden. Den qualitativen Sprung bei der Stabilisierung der Standards schafften wir erst durch das Umstellen des Puffersystems auf ein Tris/NaCl-Puffergemisch (pH 7,5), den Zusatz von 1% Lactose und 0,01 M EDTA (Abb. 5). Die proteinstabilisierenden Eigenschaften des Zuckers in Kombination mit dem Proteasehemmer EDTA erlauben den Einsatz der biologischen Standards über einen Zeitraum von > 21 Wochen.

Nach Abschluß der Arbeiten zur Haltbarkeit stand uns ein Meßverfahren zur Verfügung, daß wir in größeren Chargen produzieren konnten und somit über einen langen Zeitraum als genau definierte Untersuchungsmethode für die Bestimmung der pankreatischen Elastase in Patientenproben nutzen konnten (Abb. 13). Neben der Verfügbarkeit über einen längeren Zeitraum waren eine hohe Reproduzierbarkeit und Präzision von großer Bedeutung. Die in den Tabellen 6 und 7 aufgelisteten Ergebnisse des Intra- bzw. Interassays zeigen, daß unsere Untersuchungsmethode sowohl über die erforderliche hohe Reproduzierbarkeit und damit über eine gute Präzision verfügt.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Untersuchungsmethode zur Bestimmung der pankreatischen Elastase im Stuhl besitzt auf Grund der verwendeten polyklonalen Antikörper eine hohe Sensitivität und Spezifität. Das Meßverfahren ermöglicht eine Substitutionstherapie begleitende Diagnostik, da eine Kreuzreaktivität der eingesetzten Antikörper mit der porcinen Elastase nicht auftritt. Die hohe Stabilität der Bestandteile des Verfahrens, verbunden mit der hohen Reproduzierbarkeit und guten Präzision, sowie die einfache Testdurchführung ohne großen technischen Aufwand ermöglichen den Einsatz als Screening-Test zur Diagnose einer Pankreasinsuffizienz in jeder gastroenterologischen Praxis.

Für die Versuche zur Validierung unserer Untersuchungsmethode standen uns Stuhlproben von Probanden mit den am häufigsten auftretenden

Erkrankungen, die eine exokrine Pankreasinsuffizienz zur Folge haben können, zur Verfügung (siehe Tab. 10).

Bei der durch einen genetischen Defekt verursachten Mukoviszidose kommt es durch Dehydratation, Eindickung und Viskositätssteigerung der Pankreassekrete in 80 bis 90% der Fälle zu einer exokrinen Pankreasinsuffizienz (Abrams et al. 1984, van Hubbard et al. 1987, Herzig et al. 1996, Carrere et al. 1998). In den von uns untersuchten Stuhlproben lagen alle Elastasekonzentrationen im pathologischen Bereich. Damit konnten wir in allen Fällen, die mit anderen Untersuchungsverfahren diagnostizierte Pankreasinsuffizienz auch in unserem Verfahren nachweisen. Das die fäkale Elastasebestimmung als diagnostisches Verfahren zur Erkennung einer Insuffizienz bei Mukoviszidose-Patienten sehr gut geeignet ist, wurde bereits in zahlreichen anderen Studien nachgewiesen (Terbrack et al. 1996, Soldan et al. 1997 und Phillips et al. 1999). Bei der Mukoviszidose ist die Insuffizienz des exokrinen Pankreas wahrscheinlich so deutlich ausgeprägt, daß auch mit weniger empfindlichen Verfahren, wie dem Fluorescein dilaurate Test, eine 100% Sensitivität erreicht werden kann (Dalzell 1990).

Für den diagnostizierenden Arzt wäre natürlich interessant, ob die fäkale Elastasebestimmung für eine Diagnose der Mukoviszidose im Frühstadium geeignet ist. Hierzu können im Rahmen dieser Arbeit keine Aussagen gemacht werden, da uns das entsprechende Probenmaterial nicht zur Verfügung stand. Bei den Untersuchungen der fäkalen Proben der Mukoviszidose-Patienten konnten wir wiederum die in unserer Methode nicht vorhandene Kreuzreaktivität unserer Antikörper mit Substitutionspräparaten nachweisen. Obwohl alle Patienten mit hoch dosierten Mengen Substitutionsmittel therapiert wurden, konnte in keiner der mit unserem Verfahren untersuchten Stuhlprobe eine hohe Elastasekonzentration gemessen werden. Bei der Elastasebestimmung muß die Therapie nicht wie bei anderen indirekten Verfahren (z.B. NBT-PABA-Bestimmung und photometrische Chymotrypsinaktivitätstest) unterbrochen werden (Lankisch und Schmidt 1999).

In den fäkalen Proben von Patienten mit einer durch bildgebende Verfahren diagnostizierten chronischen Pankreatitis wiesen wir, wie zu erwarten war, bei zwei Drittel der Patienten eine Pankreasinsuffizienz nach. Bei den anderen Pankreatitiden lagen die Elastasewerte über dem Referenzwert von 200 µg/g Stuhl. Wenn sich diese ersten Ergebnisse in weiteren Untersuchungen bestätigen, wäre zu überprüfen, ob bei den Patienten, die keine Einschränkung der Elastasesekretion und damit wahrscheinlich auch keine pathologische Verminderung der Sekretion der anderen durch das exokrine Pankreas sezernierten Verdauungsenzyme zeigen, eine Therapie mit Substitutionspräparaten induziert ist.

Auffallend ist, daß der Anteil der weiblichen Patienten mit einer ausgeprägten Pankreasinsuffizienz (Werte < 100 µg Elastase/g Stuhl) gegenüber der männlichen Patientengruppe geringer ist. Bei den Patienten mit einer eingeschränkten Pankreasfunktion (Werte von 100 bis 200 µg Elastase/g Stuhl) ist der Anteil der weiblichen Erkrankten hingegen doppelt so groß wie der der männlichen Patienten.

Die gleiche Beobachtung machten wir bei Patienten, bei denen auf Grund der Anamnese und der körperlichen Untersuchung der Verdacht einer chronischen Pankreatitis bestand, diese aber durch sonographische Untersuchungsmethoden nicht eindeutig diagnostiziert werden konnte. Eine mögliche Erklärung wäre der in der männlichen Bevölkerung viel häufiger auftretende Alkoholabusus.

Bei den Probanden, die nicht eindeutig diagnostiziert werden konnten, lagen bei 50% die Elastasewerte unter dem Referenzwert, so daß mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, daß bei diesen Patienten eine Pankreasinsuffizienz vorlag. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Elastasebestimmung im Stuhl dem Arzt bei der Sicherung einer Verdachtsdiagnose der chronischen Pankreatitis hilfreich sein kann.

Wie zu erwarten war, ist unser Test für die Diagnose einer akuten Pankreatitis weniger gut geeignet, da es bei dieser Erkrankung auf Grund der akuten Entzündung des Pankreas zu einem Anstieg der Konzentration der

pankreatischen Enzyme im Serum kommt. Allerdings ergaben unsere Untersuchungen, daß bei einem Drittel der Patienten die akute Pankreatitis mit einer eingeschränkten Pankreasfunktion (Elastasekonzentration im Stuhl 100 bis 200 µg/g Stuhl) einherging. Eine schwere Pankreasinsuffizienz wurde bei keinem Patienten mit akuter Pankreatitis festgestellt. Da nicht ausgeschlossen werden kann, daß eine akute Pankreatitis allmählich in eine chronische übergeht, die Wahrscheinlichkeit liegt bei 10% (Lankisch und Büchler 2000), könnte die Bestimmung der fäkalen Elastase neben der Messung der pankreatischen Enzymkonzentrationen im Serum von Bedeutung sein. Der Anteil der männlichen Patienten mit einer eingeschränkten Pankreasfunktion ist fast fünfmal so hoch wie der Anteil der Frauen. Wahrscheinlich ist auch in diesem Fall die Ursache im unterschiedlichen Alkoholkonsum begründet.

Neben der chronischen Pankreatitis ist das Pankreaskopfkarzinom die häufigste Ursache für eine exokrine Pankreasinsuffizienz. Die Einschränkung des Abflusses der pankreatischen Enzyme in das Duodenum wird wahrscheinlich durch die Ausbildung des Pankreaskopfkarzinoms im Bereich des Pankreasausganges zum Ductus pancreaticus und ab einer bestimmten räumlichen Ausdehnung des Karzinoms verursacht. Eine exokrine Pankreasinsuffizienz tritt erst auf, wenn mehr als 60% des distalen Pankreasganges verlegt sind (DiMagno et al 1979). Ebenso kann durch ein Pankreaskopfkarzinom der Ductus choledochus abgeschnürt werden, so daß die Entwicklung eines Ikterus möglich ist.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen der Stuhlproben von Patienten mit einem chirurgisch bestätigten Pankreaskopfkarzinom zeigen, daß die Elastasebestimmung im Stuhl für die Diagnose einer Pankreasinsuffizienz und damit als Screening-Methode für diese Patientengruppe durchaus geeignet ist. Daraus ergibt sich die Empfehlung, bei Patienten mit einer eingeschränkten Pankreasenzymfreisetzung die Diagnostik auch auf das Pankreaskopfkarzinom zu erweitern.

Auch der Diabetes mellitus kann die Ursache für eine Pankreasinsuffizienz sein (Gröger et al. 1995, Lankisch et al. 2000). Diabetiker weisen signifikant

häufiger eine Insuffizienz des exokrinen Pankreas auf als gesunde Kontrollpersonen (Richter 2000, Rathmann et al. 2000, Pistrosch et al. 2000). In einer Studie (Bräuning 1998) mit 436 Typ 1- und Typ 2-Diabetikern wurde mittels der fäkalen Elastasebestimmung bei 40% der Patienten eine schwere Pankreasinsuffizienz und bei 16% eine eingeschränkte Pankreasfunktion diagnostiziert. Diese hohe Zahl der Pankreasinsuffizienz bei Diabetikern konnte in unseren Untersuchungen nicht bestätigt werden. In den von uns untersuchten 57 Stuhlproben von insulinpflichtigen Diabetikern zeigten nur 2 Proben Elastasewerte, die auf eine schwere Pankreasinsuffizienz hinweisen. Bei 11 Patienten deuteten die Werte auf eine eingeschränkte Pankreasfunktion hin. Wobei anscheinend die Pankreasinsuffizienz mit zunehmender Krankheitsdauer häufiger auftritt, so daß bei Langzeitdiabetikern die diagnostische Kontrolle der exokrinen Pankreasfunktion gefordert werden sollte. Zahlreiche in der Literatur beschriebene Untersuchungen der exokrinen Pankreasfunktion bei Diabetikern ergeben unterschiedliche Häufigkeiten der exokrinen Insuffizienz (Gröger et al. 1995, Lankisch et al. 1982, Lankisch und Schmidt 1999). Das Pankreas ist bei Diabetikern gegenüber Gesunden kleiner (Gilbeau et al. 1992), und ein Insulinmangel kann das Pankreasenzymmuster verschieben, was für die  $\alpha$ -Amylase gut belegt ist (Lankisch und Nauck 2000). Für die anderen pankreatischen Enzyme, folglich auch für die Elastase, liegen noch keine ausreichenden Untersuchungen vor. Wenn auch die pankreatische Elastase in verminderter Menge sezerniert wird und andere Enzyme nicht, weisen verminderte Elastasekonzentrationen im Stuhl nicht unbedingt auf eine exokrine Pankreasinsuffizienz hin (Gröger et al. 1995). Um exakte Aussagen zur Effizienz des von uns entwickelten Testes bei der Untersuchung der Stuhlproben von Diabetikern machen zu können, sind parallele Messungen mit dem Sekretin-Pankreozymin-Test erforderlich.

Bei der Choledocholithiasis ist das Auftreten der Pankreasinsuffizienz wahrscheinlich nicht in einer Störung der exokrinen Pankreasfunktion zu suchen, sondern in einem Reflux der Gallensteine in den Ductus pancreaticus und der dadurch hervorgerufen Einschränkung des Abflusses der

pankreatischen Enzyme in das Duodenum (Uhl et al. 1999). Von den 58 in dieser Arbeit untersuchten Stuhlproben der Patienten, bei denen ein Gallensteinleiden aber keine chronische Pankreatitis diagnostiziert wurde, weisen die Elastasewerte von 8% der Probanden auf eine ausgeprägte Pankreasinsuffizienz und von 21% auf eine eingeschränkte Pankreasfunktion hin (Abb. 18). Ähnliche Ergebnisse wurden von Klör (1998) in einer Studie von 121 Gallensteinpatienten beobachtet. Ein Drittel der Patienten wiesen Elastasewerte unter 200 µg/g Stuhl auf, davon deuteten 12 Werte auf eine schwere Pankreasinsuffizienz hin. Der Autor ist der Auffassung, daß Cholesterinsteine besonders bei Frauen die Hauptursache einer Pankreasinsuffizienz sind.

Die Gallensteine können in den Gallengang wandern, dort bis zur Papille hinunter, in die in den meisten Fällen auch der Pankreasgang mündet. Der zum Teil schmerzhaft Durchtritt dieser kleinen Gallenkonkremente verletzt die gefäßreiche, enge Papillenspitze, die nach mehreren solcher Traumata vernarbt und ein Hindernis beim Abfluß des Pankreassekretes darstellen kann. Hierin ist wahrscheinlich die Ursache der in unseren Untersuchungen festgestellten Pankreasinsuffizienz bei den Patienten mit einer mechanischen Cholestase begründet (Abb. 19).

Alle mit Stuhlproben von definierten Patientenkollektiven durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß unsere Methode der fäkalen Elastasebestimmung für die Diagnose einer Pankreasinsuffizienz gut geeignet ist. An Hand einer größeren Patientengruppe einer gastroenterologischen Klinik sollte unser Verfahren mit einer anderen fäkalen Elastase-Bestimmungsmethode und einem Testsystem zur Bestimmung der Chymotrypsinaktivität im Stuhl verglichen werden. In umfangreichen Studien ermittelten Dominguez-Munoz et al. (1995 b) und Stein (1996 b) für den handelsüblichen Elastasetest eine Sensitivität von 100% bzw. 93% und eine Spezifität von 83% bzw. 94% bei Patienten mit einer mittleren bis schweren Pankreatitis, die durch den Sekretin-Pankreozymin-Test bzw. der Computertomographie bereits diagnostiziert war. Diese hohe Sensitivität und



Spezifität konnte in unseren Untersuchungen mit diesem Testverfahren, wie der Abbildung 20 zu entnehmen ist, nicht erreicht werden. Die uns zur Verfügung stehenden Stuhlproben stammten nicht nur von Patienten mit einer diagnostizierten chronischen Pankreatitis, sondern es handelte sich um ein unausgewähltes Patientenkollektiv der gastroenterologischen Sprechstunde der Universitätsklinik für Innere Medizin Leipzig, in dem sowohl Patienten mit einer leichten Pankreatitis als auch Patienten mit einem Pankreaskopfkarzinom unterschiedlicher Schwere enthalten waren. Da eine Pankreasinsuffizienz erst bei einer Organschädigung von mehr als 90% auftritt (Goldberg et al. 1993), lagen die fäkalen Elastasewerte bei diesen Patienten sowohl bei dem handelsüblichen Elastasetest als auch bei unserem in den meisten Fällen im Normbereich. Als Screening-Test für die Diagnose einer mittleren bzw. schweren chronischen Pankreatitis ist sowohl der handelsübliche Test als auch, wie die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, das von uns entwickelte Testsystem gut geeignet.

Ein wesentlicher Vorteil unserer Untersuchungsmethode gegenüber dem kommerziell erhältlichen liegt in der höheren Sicherheit bei der Diagnose von Patienten mit Oberbauchbeschwerden, bei denen das Pankreas nicht die Ursache der Erkrankung ist. In dem von uns entwickelten Meßverfahren wurden 10 % weniger falsch positive Diagnosen gestellt als in dem handelsüblichen System.

Die höhere Spezifität der von uns entwickelten Methode gegenüber dem anderen Elastase-Bestimmungssystem liegt wahrscheinlich im Einsatz unterschiedlicher Antikörper begründet. Die von uns eingesetzten polyklonalen Antikörper haben den Vorteil, daß mehrere Epitope des Elastasemoleküls für die Antikörperbindung zur Verfügung stehen und damit auch durch den proteolytischen Abbau im Darm gespaltene Elastasemoleküle gebunden werden. Die im kommerziell erhältlichen Test eingesetzten monoklonalen Antikörper binden das Molekül nur an einem Epitop. Dies ist wahrscheinlich auch die Erklärung für die größere Anzahl der nicht pathologischen Befunde, die sowohl in der Laborpraxis Dr. Limbach (Heidelberg) als auch im Labor

Prof. Schenk (Magdeburg) mit unserem Test diagnostiziert wurden. Die Vorteile der polyklonalen Antikörper gegenüber den monoklonalen bei der Bestimmung der pankreatischen Elastase zeigte sich auch bei der Untersuchung von Patienten mit einer akuten Pankreatitis in einem Elastase-Radioimmunoassay (Keim et al. 1997). Die Elastase konnte im Serum mit den auf der Basis von polyklonalen Antikörpern aufgebauten Radioimmunoassay bedeutend länger nachgewiesen werden als mit dem ELISA, der auf monoklonale Antikörper basierte.

Außer der fäkalen Elastase wurde in dieser Studie auch die Chymotrypsinaktivität im Stuhl bestimmt. Der Vorteil der Elastasebestimmung im Stuhl gegenüber der Chymotrypsinbestimmung, wie bereits von Doppl et al. (1994) und Dominguez-Munoz et al. (1995) aufgezeigt wurde, konnte in unseren Untersuchungen bestätigt werden, allerdings fielen die Unterschiede, wie der Abbildung 20 zu entnehmen, nicht so deutlich aus. Doppl et al. erzielten in ihrer Studie eine Sensitivität der Elastasebestimmung von 77% gegenüber 46% bei der Chymotrypsinmethode. Noch deutlicher stellten sich die Unterschiede zwischen der Elastase- und der Chymotrypsinbestimmung in der Arbeit von Gullo et al. (1999) dar. Mit dem Elastasetest wurden 100% der Patienten mit einer schweren, 76,9% mit einer mittelschweren und 22,2% mit einer milden Pankreatitis richtig diagnostiziert. Dem gegenüber fallen die Werte der Chymotrypsinbestimmung (77,2%, 53,8% und 11,1%) deutlich niedriger aus. Auf einen anderen nachteiligen Aspekt der Chymotrypsinbestimmung im Stuhl machten Stein et al. (1996) und Gullo et al. (1997) außerdem aufmerksam. Wenn Patienten mit einer chronischen Pankreatitis bzw. Mukoviszidose-Patienten substituiert werden, zeigt der Chymotrypsintest bis zu dreimal höhere Werte gegenüber der Nichtsubstitution an. Die Elastasewerte werden durch eine Substitutionstherapie nicht beeinflusst. Die Bestimmung der Elastase sollte in der Diagnosefindung und in der therapiebegleitenden Diagnostik einer Pankreasinsuffizienz auf Grund der höheren Sensitivität und Spezifität und der Substitutionsmittel unabhängigen

Messung gegenüber der Chymotrypsinbestimmung bevorzugt eingesetzt werden.

Neben den fäkalen Elastasekonzentrationen bei Patienten der gastroenterologischen Sprechstunde waren natürlich auch die Werte gesunder Probanden für uns von großem Interesse. An Hand unserer Untersuchungen an einem Normalkollektiv wollten wir sehen, ob geschlechts- bzw. altersbedingte Schwankungen der Elastasekonzentrationen im Stuhl auftreten können. Die in der Abbildung 14 dargestellten Werte zeigen, daß die höchsten Elastasewerte bei den Probanden der Altersgruppe der 20- bis 30-Jährigen gemessen wurden. Zwischen den Gruppen > 30 Jahre konnten keine signifikanten Differenzen beobachtet werden. Die Elastasekonzentrationen der weiblichen Probanden waren in allen Altersgruppen höher als die der männlichen Personen. Eine mögliche Erklärung für die geschlechtlichen Unterschiede als auch für die höheren Werte der 20- bis 30-Jährigen dürften im Alkoholgenuß zu suchen sein. Bekanntlich ist der durchschnittliche Alkoholkonsum der Frauen geringer als der der Männer und bei den jüngeren Probanden ist der Zeitraum des Alkoholgenusses kürzer als bei den älteren Probanden (Reker et al 2000, Singer 2000), so daß eine alkoholbedingte Beeinträchtigung der sekretorischen Leistung des exokrinen Pankreas wahrscheinlich bei den Frauen bzw. bei den jüngeren Probanden weniger ausgeprägt ist.

Die durchgeführten Untersuchungen und Studien zeigen, daß die von uns entwickelte Methode zur Bestimmung der fäkalen Elastase ein schnelles und sicheres Testsystem zur Diagnose bzw. zum Ausschluß einer exokrinen Pankreasinsuffizienz ist. Da Stuhl als Untersuchungsmaterial eingesetzt wird, ist die Methode gegenüber den sondenabhängigen Verfahren für den Patienten nicht belastend. Durch die höhere diagnostische Wertigkeit ist unser Verfahren dem kommerziell erhältlichen Test und der Chymotrypsinmessung überlegen. Für die begleitende Diagnostik einer Substitutionstherapie ist die nicht vorhandene Kreuzreaktivität unserer Methode mit der pankreatischen Elastase des Schweines von großer Bedeutung.

Durch die hohe Stabilität der Testbestandteile und durch die einfache Handhabung der Methode kann diese in jedem gastroenterologischem Labor durchgeführt werden.

## **5. Zusammenfassung**

Die chronischen Erkrankungen des exokrinen Pankreas gehören zu den am schwierigsten zu diagnostizierenden Krankheitsbildern. Für die Diagnose der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinoms als wichtigste chronische Erkrankungen des exokrinen Pankreas stehen dem behandelnden Arzt eine Reihe von morphologischen und direkten bzw. indirekten Methoden zur Verfügung. Besonders die indirekten Verfahren haben oft eine sehr geringe Spezifität bzw. Sensitivität.

In der vorliegenden Arbeit wird eine neu entwickelte indirekte Labormethode für die Diagnose einer gestörten Pankreassekretion, die zur Pankreasinsuffizienz führen kann, vorgestellt. Als Marker für den Nachweis bzw. den Ausschluß einer Insuffizienz des exokrinen Pankreas nutzten wir die humane pankreatische Elastase 1, die durch polyklonale anti-Peptid-Antikörper in fäkalen Proben nachgewiesen wird. Die Elastase 1 ist zum Nachweis einer Pankreasfunktionsstörung sehr gut geeignet, weil sie sich durch eine äußerst hohe Stabilität während der Darmpassage auszeichnet.

Für die Herstellung der polyklonalen Antikörper verwendeten wir nicht das Gesamtmolekül, sondern Oligopeptide, die Aminosäuresequenzen enthalten, die nur in der humanen pankreatischen Elastase zu finden sind. Alle elf polyklonalen Antikörper, die auf der Basis der Peptide hergestellt wurden, zeigten eine hohe Spezifität zu ihren Oligopeptiden.

Für den Aufbau der Bestimmungsmethode entschieden wir uns für die Antikörper K 10 und K 12, die eine hohe Spezifität zum Zielantigen, der humanen pankreatischen Elastase 1, zeigten.

Als Standards verwendeten wir keine gereinigte Elastase 1, sondern gereinigte und inaktivierte Stuhlproben, damit unser Standardmaterial dem zu untersuchenden Probenmaterial möglichst ähnlich war.

In umfangreichen Untersuchungen konnten wir nachweisen, daß die exakte Einhaltung des Zeit- bzw. Temperaturregimes bei der Extraktion der Stuhlproben essentiell für die Reproduzierbarkeit der Elastase1-Bestimmung ist. Schon geringe Abweichungen von der Standardmethode können falsche Ergebnisse bei der Messung der Elastase 1 ergeben.

Auf Grund der in Langzeitversuchen nachgewiesenen hohen Stabilität aller Bestandteile unserer Bestimmungsmethode ist es möglich, über einen längeren Zeitraum Untersuchungen mit einer guten Reproduzierbarkeit durchzuführen.

Die durchgeführten Intra- bzw. Interassay's zeigten für unsere Untersuchungsmethode eine sehr gute Reproduzierbarkeit und hohe Präzision. Wir konnten beweisen, daß wir in der Lage sind, unsere Bestimmungsmethode in größeren Chargen und in verschiedenen Herstellungen in hoher Qualität zu produzieren.

Besonders wichtig war es, nachzuweisen, daß unsere Labormethode keine Kreuzreaktivität zu Substitutionsmitteln, die u.a. lyophilisierte Schweinepankreasauszüge enthalten, aufweist. In den Versuchen mit fünf handelsüblichen Substitutionspräparaten konnten wir keine Beeinflussung unserer Methode durch diese Medikamente feststellen, so daß die Elastase 1-Bestimmung für die therapiebegleitende Diagnostik eingesetzt werden kann.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Bestimmungsmethode wurde an einer großen Anzahl Stuhlproben von Patienten mit verschiedenen chronischen Erkrankungen des exokrinen Pankreas validiert. Eine besonders hohe diagnostische Spezifität (100%) erreichten wir bei der Diagnose einer Pankreasinsuffizienz bei Kindern mit einer manifestierten Mukoviszidose. Bei Patienten mit einer sicher diagnostizierten chronischen Pankreatitis bzw. eines Pankreaskopfkarzinoms unterschiedlichen Schweregrades konnten wir bei 64% bzw. 61% eine Pankreasinsuffizienz nachweisen. In einem Krankenkollektiv, in dem Patienten zusammengefaßt wurden, bei denen auf Grund der Anamnese

und der körperlichen Untersuchung der Verdacht einer chronischen Pankreatitis bestand, diese aber sonographisch noch nicht diagnostiziert werden konnte, lag der Anteil der mit unserer Bestimmungsmethode diagnostizierten Pankreasinsuffizienz bei 50%.

In einer umfangreichen Studie mit einem unausgewählten Patientenkollektiv (699 Patienten) wurde unsere Bestimmungsmethode mit einem kommerziell erhältlichen Elastase 1-Test und einem Chymotrypsin Kinetik Test verglichen. Die Spezifität und Sensitivität unserer Methode (75% bzw. 50%) war höher als die der kommerziell verfügbaren Elastase 1-Bestimmung (63% bzw. 48%) und des Chymotrypsintestes. Die Ergebnisse zeigen, daß unsere Methode zur Bestimmung der humanen pankreatischen Elastase 1 in fäkalen Proben im Vergleich zu den marktüblichen indirekten Testmethoden für die Diagnose einer Insuffizienz des exokrinen Pankreas wahrscheinlich besser geeignet ist.

Die hohe Stabilität der Bestandteile des Verfahrens, verbunden mit der guten Reproduzierbarkeit und hohen Präzision, sowie die einfache Testdurchführung ohne großen technischen Aufwand ermöglichen den Einsatz als Screening-Test zur Diagnose einer Pankreasinsuffizienz, insbesondere bei Risikogruppen, in jeder gastroenterologischen Praxis.